

# **Chemische Modifikation von OmpG und VDAC zur Herstellung von Hybridionenkanälen**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Diplom-Chemiker

**Boris Hirsch**

aus Freiburg im Breisgau

Marburg/Lahn 2015

---

---

---

Die vorliegende Arbeit entstand an der Philipps-Universität Marburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. U. Koert in der Zeit von September 2009 bis März 2015.

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkennziffer 1180)  
als Dissertation am 17.04.2015 angenommen

Erstgutachter: Prof. Dr. U. Koert

Zweitgutachter: Prof. Dr. Geyer

Tag der mündlichen Prüfung: 19.06.2015

---

### **Erklärung:**

Ich erkläre, dass eine Promotion noch an keiner anderen Hochschule als der Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie, versucht wurde.

Ich versichere, dass ich meine vorgelegte Dissertation

*„Chemische Modifikation von OmpG und VDAC zur Herstellung von Hybridionenkanälen“*

selbst und ohne fremde Hilfe verfasst, nicht andere als die in ihr angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt, alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate als solche gekennzeichnet sowie die Dissertation in der vorliegenden oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen in- oder ausländischen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht habe.

Marburg, 17.04.2015 \_\_\_\_\_

(Boris Hirsch)

---

## Zusammenfassung:

Membranproteine wie passive Kanäle und Poren, aktive Transporter und Rezeptoren sind essentiell für die Kommunikation zwischen Zellen, als auch für den Fluss von Substanzen über die von der Zellmembran geformten Permeabilitäts-Barrieren. Aufgrund dieser Eigenschaften stehen Membranproteine als Angriffsziel für Wirkstoffe im Interesse der pharmazeutischen Industrie. Durch chemische, sowie biologische Methoden zur Funktionalisierung kann das Verhalten von Ionenkanälen verändert werden, wodurch Einblicke in die Funktionsweise dieser Kanäle gewonnen wird. Diese Informationen können anschließend verwendet werden als Basis zur Gestaltung komplexer Biohybrid-Systemen, sowie um neue Angriffsziele für Wirkstoffe zu detektieren und um komplexere biochemische Kaskaden zu Verstehen.

In der vorliegenden Arbeit wurden chemische Modulatoren zur Funktionalisierung der Pore OmpG und VDAC hergestellt. Das integrale Membranprotein OmpG, welches in der äußeren Membran des Gram-negativen Bakteriums *Escherichia coli* vorkommt, bildet ein  $\beta$ -barrel aus 14  $\beta$ -Faltblättern mit einem Innendurchmesser von  $12 \cdot 15 \text{ \AA}$ . VDAC kommt vorwiegend in der äußeren Membran von Mitochondrien vor und bildet ein  $\beta$ -barrel aus 19  $\beta$ -Strängen. Der Innendurchmesser wird durch eine in die Pore reichende  $\alpha$ -Helix, welche essentiell für das Schaltverhalten ist, auf  $15 \cdot 26 \text{ \AA}$  begrenzt.

Die Modifizierung von OmpG sollte über doppelte S-Alkylierung von Cysteinen im Poreninnenraum mit Haloacetamiden erfolgen. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Herangehensweisen benutzt: Zum Einen wurden monofunktionalisierte Bipyridin-Linker hergestellt, welche nach Einbringen in die Pore mit Schwermetallen wie Kupfer einen stabilen Komplex bilden sollen, der die Pore blockiert. Zum Anderen wurden Bishaloacetamide mit unterschiedlichen Kernen synthetisiert, welche direkt bei der Reaktion mit OmpG eine Querverstrebung durch die Pore bilden und damit die Leitfähigkeit der Pore reduzieren sollten.

Von den hergestellten Bipyridin-Linkern zeigte eine Verbindung erfolgreichen Umsatz mit OmpG und es gelang von diesem Biohybrid eine Röntgenkristallstruktur zu erhalten, welche zwei Bipyridin-Linker kovalent in der Pore gebunden zeigt. ICP-Messungen des Kupferanteils in dem dialysierten Biohybrid zeigten, dass dieser in der Lage ist Kupfer zu binden, dabei allerdings keine vollständige Sättigung erreicht wurde. BLM-Messungen zur Bestimmung der Leitfähigkeit zeigten hingegen keine Änderung nach Zugabe von Kupfer(II)sulfat.

Bei den Bishaloacetamiden wurde der Fokus auf Terphenyl- und Azakronenether-Rückränder gelegt. Es gelang Bishaloacetamide von einem ein wasserlöslichen Terphenyl, sowie von einer Azakrone mit Glycinspacern herzustellen und mit OmpG umzusetzen. Beide Umsetzungen zeigten uneindeutige Ergebnisse bezüglich der Querverknüpfung, allerdings gelang es Proteinkristall zu erhalten, welche allerdings nicht prozessiert werden konnten.

Zur Modifikation einer VDAC-Deletionsmutante sollte ein chemisch modifiziertes Peptid über *native chemical ligation* (NCL) in VDAC eingebracht werden. Ein entsprechender Peptidthioester aus zehn Aminosäuren wurde mittels SPPS sowie mittels Fragmentsynthese hergestellt. Nur die Fragmentsynthese erbrachte das gewünschte C-Terminal entschützte Peptid in hoher Reinheit. Reaktionen, um dieses Peptid in den benötigten Ethylthioester für die NCL zu überführen, führten zu einer Mischung aus Ethylthio- und Methylester, welche nicht getrennt werden konnte. Es konnte kein sauberer Thioester für die NCL hergestellt werden.

---

---

## Summary:

Membrane proteins like passive channels and pores, active transporters and receptors are essential for the communication between cells as well as for the transport of matter across the permeability barrier formed by cell membranes. Due to this properties, membrane proteins are of interest as targets for the pharmaceutical industry. The performance of ion channels can be modulated with the help of chemical as well as biological functionalization methods, through which insight can be gained into the functionality of these pores. This information could be further used as basis for the design of complex biohybrid systems, for the detection of new targets of drug action and for the understanding of complex biochemical cascades.

In this work, chemical modulators for the functionalization of the porins OmpG and VDAC were prepared. The integral membrane protein OmpG, which can be found in the outer membrane of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*, shows a  $\beta$ -barrel fold formed by 14  $\beta$ -stands with an inner lumen of  $12 \cdot 15 \text{ \AA}$ . VDAC occurs mostly in the outer membrane of mitochondria and forms a  $\beta$ -barrel consisting of 19  $\beta$ -stands. An  $\alpha$ -helix, which is essential for the gating behavior, is located inside the pore and restricts the inner lumen to  $15 \cdot 26 \text{ \AA}$  diameter

The modification of OmpG should be accomplished by a twofold S-alkylation of cysteines in the inner conductive pathway by haloacetamides. Therefore, two different pathways approaches were used: One method employed, monofunctionalized bipyridine-linkers were produced, which, after introducing into the pore, could form a stable complex with heavy metal ions like copper and hence, block the pore. In a more straight forward way, bishaloacetamides with different backbones were synthesized, which should form directly a molecular bar through the middle of the conductive pathway und reduce the conductivity.

Of the synthesized bipyridine-linkers, one could be successfully reacted with OmpG and an X-ray structure of this biohybrid was obtained showing both bipyridine-linker covalently bound to the inside of the pore. ICP measurements of the copper proportion in the dialyzed biohybrid revealed its ability to bind copper while it was below the calculated copper saturation. However, BLM measurements for the identification of conductivity showed no change after the addition of copper(II)sulfat.

For the bishaloacetamid route, the focus lay on terphenyl and azacrownether backbones. A water-soluble terphenyl and an azacrown with glycine spacers could both be transformed to bishaloacetamides which were reacted with OmpG. Both reactions showed ambiguous results towards the two point functionalization. The grown protein crystals of the complex could not be processed.

For the modification of a VDAC mutant with a partly missing  $\alpha$ -helix, a chemical modified peptide should be introduced to the protein by native chemical ligation (NCL). An appropriate peptide thioester consisting of ten amino acids was synthesized by SPPS and by fragment condensation. Only the peptide made by fragment condensation gave the desired C-terminal deprotected peptide in high purity. Reactions to convert this peptide into the ethylthioester needed for the NCL gave a mixture consisting of ethylthioester and methylester, which could not be separated. It was not possible to get a pure thioester to be reacted with VDAC via NCL.

---

## Wissenschaftlicher Werdegang:

### Persönliche Daten

---

Name: Boris Hirsch  
Geburtsort: Freiburg im Breisgau  
Geburtsdatum: 30.03.1985  
Nationalität: Deutsch

### Lebenslauf

---

08/1995 – 05/2004     **Gymnasium am Hobtbühl/VS-Villingen**, Abschluss:  
Abitur

10/2004 – 12/2008     **Studium der Chemie**, Philipps-Universität Marburg,  
Abschluss: Diplom

01/2009 – 07/2009     **Diplomarbeit**, Philipps-Universität Marburg,  
Arbeitsgruppe Prof. Dr. U. Koert, Synthese von  
Bis(iodacteamiden) als Bausteine zur  
Porenzweipunktanknüpfung

Seit November 2009     **Promotionsstudium**, Philipps-Universität Marburg,  
Arbeitsgruppe Prof. Dr. U. Koert, Chemische Modifikation  
von OmpG und VDAC zur Herstellung von  
Hybridionenkanälen



---

## **Danksagung:**

Herrn Prof. Dr. Koert danke ich für die interessante und vielseitige Themenstellung, die hervorragenden Arbeitsbedingungen in seiner Arbeitsgruppe, die sehr gute Betreuung und die zahlreichen fachlichen Ratschläge. Weiterhin gilt mein Dank seinem klar strukturierten Seminar, welches half das Wissen über die organische Chemie zu erweitern.

Herrn Prof. Dr. Geyer danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Martina Pfeiffer danke ich für die zügige Bestellung von Chemikalien, für die Bestellung von Literatur, sowie für die wertvolle Hilfe bei allen organisatorischen Dingen.

Meinen Kooperationspartnern Wolfgang Große, Georgios Psakis und Barbara Mertins danke ich für die exzellente Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft bei Fragen und die interessanten fachlichen Diskussionen.

Bei der NMR-Abteilung des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg möchte ich mich bei Gert Häde, Klaus Pützer, Dr. Roland Wagner und Dr. Xiulan Xie für die zahlreichen Messungen bedanken. Für die Ermittlung von Kristallstrukturdaten danke ich Gertraud Geisler, Radostan Riedel und Dr. Klaus Harms. Bei der massenspektrometrischen Abteilung bedanke ich mich bei Jan Bamberger, Natalia Fritzler, Dr. Klaus Steinbach und Dr. Uwe Linne für die Durchführung von ESI-, EI- und HPLC-MS-Messungen. Hervorheben möchte ich das große Engagement der Mitarbeiter der IT- und Elektronikwerkstatt Helmut Ruhwedel und Mario Rhiel.

Bei den ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern des Arbeitskreises bedanke ich mich für die große Hilfsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre. Weiterhin möchte ich mich für synthetische Tipps, das sorgfältige Korrekturlesen, Kanutouren, Fußballturniere, Kaffeerunden, Drachenbootrennen und einiges mehr bedanken.

Meinem Vertiefer Johnatan Tripp danke ich für die synthetische Unterschätzung und tollen Gespräche. Den Studenten Christopher Sherwood, Erik Pfeiffer, Fabian Daus, Fadi Einuz und Frank Kilgenstein, die ich kennen lernen durfte, danke ich für interessante Gespräche und schöne Feierabendgestaltungen.

---

Meinen Laborpartneren Mike Dischmann und Nicola Sandner danke ich für die schöne Zeit im Labor mit interessanten Gesprächen, Diskussionen und Ablenkung.

Allen meinen Freunden danke ich für die Zeit abseits des Labors, dafür dass sie mir halfen Energie zu schöpfen, mich motivierten und aufbauten, wenn es gerade mal wieder etwas holpriger lief. Auf weitere schöne Abende zusammen.

Meiner Familie danke ich für die finanzielle und moralische Unterstützung während des Studiums, der Promotion und sonst in allen Lebenslagen.

Meiner Freundin Sandra Nicolai danke ich für die schöne Zeit zusammen, den Halt, den sie mir gegeben hat und noch gibt und die moralische Unterstützung.

## Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl
Ac <sub>2</sub> O	Essigsäureanhydrid
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfate
αHL	α-Hämolysin
br	breit
ber.	berechnet
BLM	black lipid membrane
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-
brsm	<i>based on recovered starting material</i> , basierend auf reisoliertem Edukt
Bu	Butyl-
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
Cbz	Benzyloxycarbonyl-
C <sub>8</sub> E <sub>4</sub>	<i>n</i> -Octyltetraoxyethylen
d	Dublett (NMR)
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatogramm
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCHA	Dicyclohexylamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EtSH	Ethanthiol
eq.	Äquivalente
EI	electron ionization, Elektronenstoßionisation
ESI	Elektronensprayionisation (MS)
Fmoc	Fluorenylmethyloxycarbonyl
gef.	gefunden
h	Stunde
HATU	1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate
HILIC	<u>h</u> ydrophilic <u>i</u> nteraction <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol

---

HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HRMS	hochaufgelöste Massenspektrometrie
IBs	<i>inclusion bodies</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
LDA	Lithiumdiisopropylamid
Lsg.	Lösung
m	Multiplett (NMR), mittlere Intensität (IR)
m.p.	<i>melting point</i> , Schmelzpunkt
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MTBE	<i>tert</i> -Butylmethylether
NCL	<i>native chemical ligation</i>
NEt <sub>3</sub>	Triethylamin
o	Octett
OG	<i>n</i> -Octyl-glycopyranosid
OmpG	<u>O</u> uter <u>m</u> embrane <u>p</u> rotein <u>G</u>
OAc	Acetat
<i>p</i> -TsOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
ppb	parts per billion
ppm	parts per million/NMR-Shift
q	Quartett (NMR)
<i>R<sub>f</sub></i>	Retentionsfaktor
RMSD	Root-mean-square deviation
RP	<i>reversed phase</i> Kieselgel
RT	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR), starke Intensität (IR)
sat.	saturated
SDS	<u>s</u> odium <u>d</u> edecyl <u>s</u> ulfate
SDS-PAGE	<u>s</u> odium <u>d</u> edecyl <u>s</u> ulfate <u>p</u> oly <u>a</u> rylamide gel <u>e</u> lectrophoresis
sept	Septett
t	Triplett (NMR)/Zeit
T	Temperatur
TAMPAL	<u>T</u> rytl- <u>A</u> ssociated <u>M</u> ercaptopropionic <u>A</u> cid- <u>L</u> eucine

---

TCEP	<i>tris</i> -(2-Carboxyethyl)phosphin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TLC	thin layer chromatography
TMEDA	Tetramethylethylendiamin
TMS	Trimethylsilyl
Urea	Harnstoff
VDAC	voltage-dependent anion channel
w	geringe Intensität

### Physikalische Größen und Verschiebungen

$[\alpha]$	spezifischer Drehwert
$c$	Stoffmengenkonzentration
$\delta$	chemische Verschiebung
$\lambda$	Wellenlänge
$\nu$	Wellenzahl

---

## Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

Aminosäure	3-Buchstabencode	1-Buchstabencode
Alanin	Ala	A
Asparagin oder Aspartat	Asx	B
Cystein	Cys	C
Aspartat	Asp	D
Glutamat	Glu	E
Phenylalanin	Phe	F
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Lysin	Lys	K
Leucin	Leu	L
Methionin	Met	M
Asparagin	Asn	N
Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q
Arginin	Arg	R
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Valin	Val	V
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Glutamin oder Glutamat	Glx	Z

## Abkürzung der verwendeten OmpG-Mutante

OmpG/ $\Delta$ l6/C13/C154      OmpG/W217A/ $\Delta$ 218-229 mit M13C und E154C-Mutation auf Basis von OmpG

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IX
----------------------------	----

Inhaltsverzeichnis.....	XIII
-------------------------	------

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>- 1 -</b>
1.1 Zellmembran und Ionenkanäle .....	- 1 -
1.2 Porine .....	- 3 -
1.3 Outer Membrane Protein G .....	- 5 -
1.4 Voltage-dependent anion channel .....	- 8 -
1.5 <i>Black lipid membranes</i> .....	- 13 -
1.6 Synthetische Ionenkanäle .....	- 16 -
1.7 Chemische Modifikation von Proteinen und Ionenkanälen .....	- 26 -
1.8 OmpG und VDAC-Biohybride .....	- 33 -
<b>2. Zielsetzung .....</b>	<b>- 36 -</b>
<b>3. Syntheseplanung und Durchführung .....</b>	<b>- 38 -</b>
3.1. Modulatoren für OmpG.....	- 38 -
3.1.1 Synthese der Carboxyl- und Diethylenglycolesterterphenyle .....	- 40 -
3.1.2 Synthese des Terphenylsulfonates <b>59</b> .....	- 44 -
3.1.3 Synthese der Bisiodacetamid-Azakronen.....	- 45 -
3.1.4 Synthese von Bipyridinen zur doppelten Ein-Punkt-Anknüpfung.....	- 51 -
3.2. Native chemische Ligation von VDAC .....	- 54 -
3.2.1 Retrosynthese des Decamers <b>88</b> .....	- 54 -
3.2.2 Synthese des Tetramers <b>90</b> .....	- 56 -
3.2.3 Synthese des Hexamers <b>91</b> .....	- 57 -
3.2.4 Herstellung des Decamers <b>88</b> und Entschützung zu <b>117</b> .....	- 59 -
3.2.5 Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS) .....	- 60 -
3.3 Darstellung von rekombinantem Protein.....	- 63 -
3.3.1 Transformation in chemisch kompetente Zellen .....	- 64 -
3.3.2 Ansetzen von Übertag- und Übernachtskulturen .....	- 64 -
3.3.3 Präparative Expression .....	- 65 -
3.3.4 Präparativer Zellaufschluss .....	- 65 -
3.3.5 Aufreinigung der <i>inclusion bodies</i> .....	- 66 -
3.3.6 Rückfaltung des Proteins und Protolyse mit Proteinase K.....	- 66 -
3.3.7 Aufkonzentration des Proteins .....	- 67 -

---

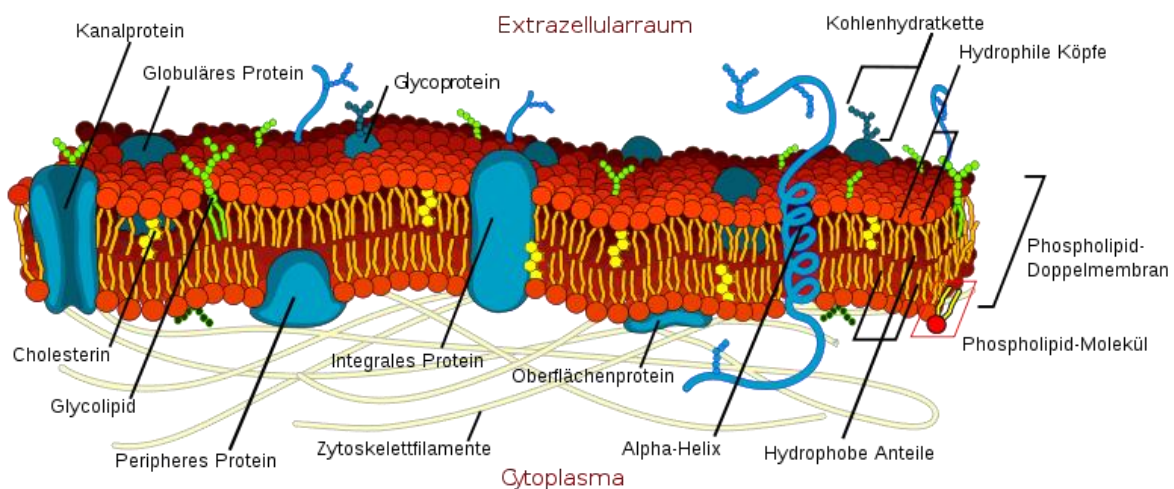
<b>4. Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>- 68 -</b>
4.1 Ergebnisse bei OmpG.....	- 68 -
4.1.1 Reaktionen mit Terphenyl <b>59</b> .....	- 68 -
4.1.2 Umsatz mit Iodacetamidkronen <b>35, 36, 37</b> und <b>64</b> . ....	- 75 -
4.1.3 Zeitmessungen und Testreaktionen von <b>37</b> und <b>59</b> . ....	- 77 -
4.1.4 Umsatz der Bipyridine <b>38</b> und <b>80</b> mit OmpG .....	- 81 -
4.2 Ergebnisse bei der Peptidsynthese für VDAC .....	- 85 -
<b>5. Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>- 91 -</b>
<b>6. Experimenteller Teil .....</b>	<b>- 96 -</b>
6.1 Allgemeine Bedingungen.....	- 96 -
6.1.1 Lösungsmittel und Schutzgasarbeiten .....	- 96 -
6.1.2 Schutzgasarbeiten und Lichtausschluss .....	- 96 -
6.1.3 Chromatographie.....	- 97 -
6.1.4 Automatisierte Synthese von Peptiden an fester Phase (SPPS) .....	- 98 -
6.1.5 SDS-PAGE.....	- 99 -
6.1.6 Physikalische Daten .....	- 99 -
6.1.7 Sprache .....	- 101 -
6.2 Synthesevorschriften .....	- 102 -
6.2.1 Synthese der Terphenyle .....	- 102 -
6.2.2 Synthese der Bipyridine .....	- 123 -
6.2.3 Synthese der Diazakronen.....	- 136 -
6.2.4 Synthese der Peptide .....	- 150 -
6.3 Kristallstrukturendaten .....	- 184 -
6.3.1 Röntgenstrukturanalyse des Sulfonats <b>59</b> .....	- 184 -
6.3.2 Röntgenstrukturanalyse der Krone <b>36</b> .....	- 190 -
<b>7. Literatur .....</b>	<b>- 196 -</b>



# 1. Einleitung

## 1.1 Zellmembran und Ionenkanäle

Zellen bestehen aus verschiedenen Komponenten wie Enzymen, DNA, RNA und Nährstoffen. Diese sollen in der Zelle lokalisiert bleiben und gleichzeitig muss ein Austausch mit der Umgebung für Nährstoffe und Metaboliten gewährleistet sein. Hierfür ist eine hydrophobe Phospholipid-Doppelschicht verantwortlich. Sie ist für hydrophobe Stoffe durch Diffusion durchlässig, hingegen für hydrophile sowie ionische Stoffe beinahe undurchlässig. Sowohl an als auch in der Membran sind die so genannten Membranproteine lokalisiert, welche für die Kommunikation und den Austausch der Zelle mit der Umgebung verantwortlich sind. Sie machen etwa ein Drittel aller in einer Zelle vorkommenden Proteine aus und 30% aller Gene sind nur für die Codierung der membranständigen Proteine da.<sup>[1]</sup>



**Abb. 1.1:** Modell einer eukaryotischen Zellmembran.<sup>[2]</sup>

Membranproteine werden in zwei Klassen unterteilt. Die eine Klasse bilden die peripheren Membranproteine, welche auf der Lipiddoppelschicht sitzen und zum großen Teil durch polare Interaktionen dort assoziiert sind. Auf Grund dessen besitzen sie eine große polare Oberfläche und unterscheiden sich nur wenig von löslichen Proteinen. Die andere Klasse sind die integralen Membranproteine, welche fast alle die Membran durchspannen und über hydrophobe Wechselwirkungen in der Membran eingebettet sind.

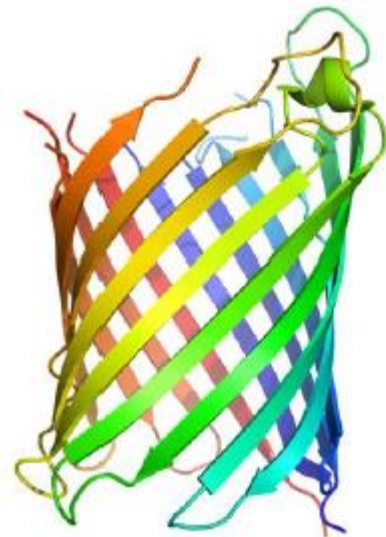
Die Vielfalt der Ausprägung dieser zwei Klassen reicht von Enzymen und Rezeptoren über Transporter bis zu Ionenkanälen.<sup>[3]</sup> Die letzten beiden Arten sind für den Austausch von

---

polaren Stoffen durch die Lipiddoppelschicht verantwortlich. Sie regeln unter anderem das Zellvolumen, den pH-Wert der Zelle, An- und Abtransport von Nährstoffen und Metaboliten und sind für die Reizweiterleitung verantwortlich.<sup>[4]</sup>

Der durch Membranproteine erfolgte Transport wird in den passiven Transport entlang eines Potentialgefälles und den aktiven Transport mittels Energieaufwand unterteilt. Der aktive Transport wird benötigt um einen Gradienten aufzubauen bzw. zu erhalten. Die erforderlichen Ionen werden hierbei mittels einer Energiequelle, meistens ATP, entgegen eines Konzentrationsgefälles transportiert. Einige Beispiele für den aktiven Transport bieten die  $\text{Ca}^{2+}$ - und die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, für deren funktionelle Aufklärung 1997 der Nobelpreis an *J. C. Skou*, *P. D. Boyer* und *J. E. Walker* vergeben wurde.<sup>[5]</sup> Der passive Transport hingegen kann durch äußere Einflüsse gesteuert werden. Ionenkanäle können beispielsweise durch mechanische (*mechano-gating*), potenzielle (*potential-gating*) oder chemische Reize (*ligand-gating*) geöffnet oder geschlossen werden.<sup>[6]</sup>

Häufig anzutreffende Strukturmodule bei integralen Proteinen sind  $\beta$ -Faltblätter sowie  $\alpha$ -Helices, wobei Letztere am weitesten verbreitet sind. Bekannteste Vertreter dieser Art sind unter anderem Rhodopsin und der Kaliumkanal KcsA. Bei den  $\beta$ -Faltblättern sind vor allem die so genannten  *$\beta$ -barrels* zu erwähnen, fassähnliche Strukturen, die die Membran vollständig durchdringen. Dazu gehören zum Beispiel Porine wie OmpG (Abb. 2). Weiterhin können Membranproteine auch aus einer Kombination aus beiden Strukturmodulen



**Abb. 1.2:** monomeres OmpG.<sup>[9]</sup>

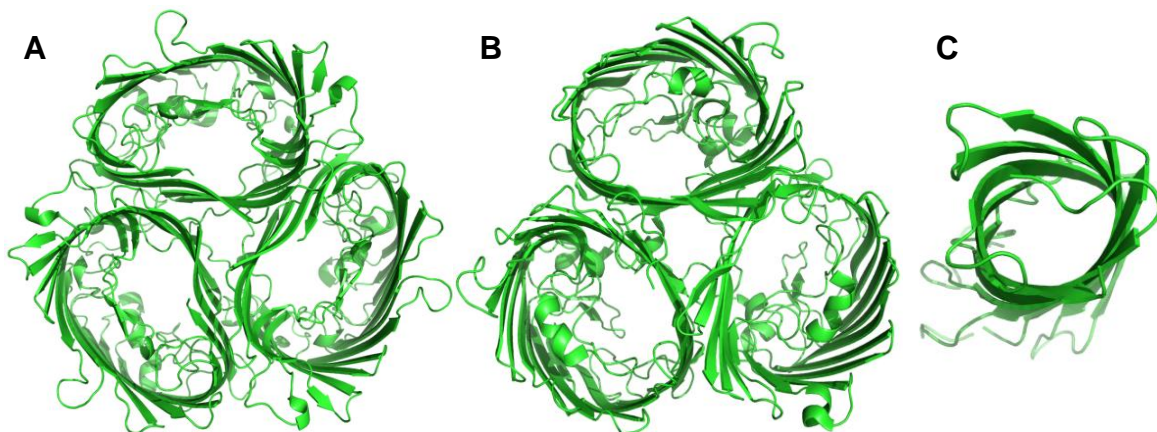
bestehen wie bei der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Hierbei ist die  $\beta$ -Faltblattstruktur der Anker in der Membran und die  $\alpha$ -Helixstruktur der funktionelle Teil.

Ionenkanäle sind an vielen verschiedenen Prozessen in Organismen beteiligt. Dazu zählen Signalweiterleitung durch Potentialänderungen, Stoffwechselvorgänge in Magen, Darm und Nieren sowie Muskelkontraktion. Wie wichtig Ionenkanäle sind zeigen auch Krankheiten, die auf Mutationen im entsprechenden Gen des Proteins zurückzuführen sind. So führen Defekte in Kationenkanälen zu Erkrankungen wie Epilepsie, Farbblindheit, Migräne, Herzrhythmusstörungen (ARVD, Long-QT Syndrom) und Diabetes. Defekte in Anionenkanälen können zu Mukoviszidose, Taubheit und Osteoporose führen.<sup>[7]</sup>

## 1.2 Porine

Porine sind Poren mit  $\beta$ -barrel-Struktur. Sie sind typischerweise für unselektiven Transport von Ionen sowie für die Aufnahme von Nährstoffen wie Aminosäuren, Zuckern und Nukleotiden von einer Größe bis zu 600 Da verantwortlich. Sie kommen am häufigsten in der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien vor in welcher  $\beta$ -barrels das einzige Transmembran-Motiv darstellen. Porine sind neben der äußeren Membran aber auch in Mitochondrien und Chloroplasten zu finden. Andere Vorkommen sind nicht bekannt.<sup>[8, 9, 10]</sup>

Die Tertiärstruktur aller Porine, deren  $\beta$ -barrel-Struktur, ist fast immer aus einer geraden Anzahl von  $\beta$ -Strängen aufgebaut. Die  $\beta$ -Strängen sind immer paarweise antiparallel angeordnet und im Winkel von rund  $45^\circ$  zueinander geneigt. Im Gegensatz zu löslichen Proteinen, bei denen ein  $\beta$ -barrel im Regelfall aus bis zu 8  $\beta$ -Strängen besteht, kann die Anzahl der Stränge zwischen 8 (z.B. OmpA und OmpX, Abb. 1.3) und 24 (FepA und FhuA) liegen.<sup>[12]</sup> Im Regelfall besteht allerdings ein  $\beta$ -barrel aus 16 bis 18 Strängen (z.B. OmpF und ScrY, Abb. 1.3).<sup>[8]</sup> Die einzelnen  $\beta$ -Stränge sind auf der Membranınnenseite über kurze Schleifen, den so genannten *turns*, verbunden. Auf der Außenseite sind lange Schleifen (*loops*) anzutreffen. Die *loops* und *turns* bestehen im Regelfall aus hydrophilen Resten. Vor allem in den *loop*-Regionen ist die Variation der Aminosäuren sehr hoch. Diese sind auch teilweise für das Öffnen und Schließen der Pore verantwortlich.<sup>[8, 12]</sup>



**Abb. 1.3:** A: Trimeres ScrY mit 18  $\beta$ -Strängen (PDB-Eintrag 1A0S), B: Trimeres OmpF mit 16  $\beta$ -Strängen (PDB-Eintrag 3K1B), C: monomeres OmpA mit 8  $\beta$ -Strängen (PDB-Eintrag 1BXW).

Im Gegensatz zu auf  $\alpha$ -Helices basierenden Kanalproteinen weisen sie nicht 20 bis 30 unpolare Reste auf, sondern durchspannen die Membran lediglich mit 7 bis 8 Aminosäuren. Die der Membran zugewandten Reste sind unpolar. Aufgrund von Hydrophilie innerhalb der

---

Pore sollten die Aminosäuren auf der Innenseite der Pore polar sein. Dies ist allerdings selten strikt der Fall, wodurch eine sequenzbasierte Vorhersage einer  $\beta$ -barrel-Struktur äußerst erschwert wird.<sup>[11]</sup>

Porine weisen im Allgemeinen keine Cysteine in ihrer Sequenz auf, haben mehr negative geladene Aminosäuren, keine langen hydrophoben Bereiche und liegen meistens als trimere Homooligomere in der Membran vor. Das C-terminale Ende besteht immer aus Phenylalanin, welches als Insertionsanker für den Einbau in die Membran benötigt wird.<sup>[10]</sup>

Porine werden in drei Klassen unterteilt, die sich aufgrund der unterschiedlichen Selektivitäten und *gating*-Eigenschaften unterscheiden. Es gibt die allgemeinen, substratspezifischen und ligandengesteuerten Porin.<sup>[10, 13, 14]</sup>

Die allgemeinen Porine weisen keine besondere Selektivität auf. Eine gewisse Ionenselektivität kann durch die Anordnung der Aminosäuren im Kanal erreicht werden, aber der Durchmesser der Pore ist meistens so groß, dass der Effekt nicht sonderlich ausgeprägt ist.<sup>[15]</sup> Einer der bekanntesten Vertreter hierbei ist OmpF (Abb. 1.3). Viele Vertreter dieser Klasse werden im Inneren der Pore von einer *loop* durchzogen, welcher z.B. bei OmpF den Durchmesser der Pore auf  $7 \cdot 11 \text{ \AA}$  verengt.<sup>[15, 16]</sup>

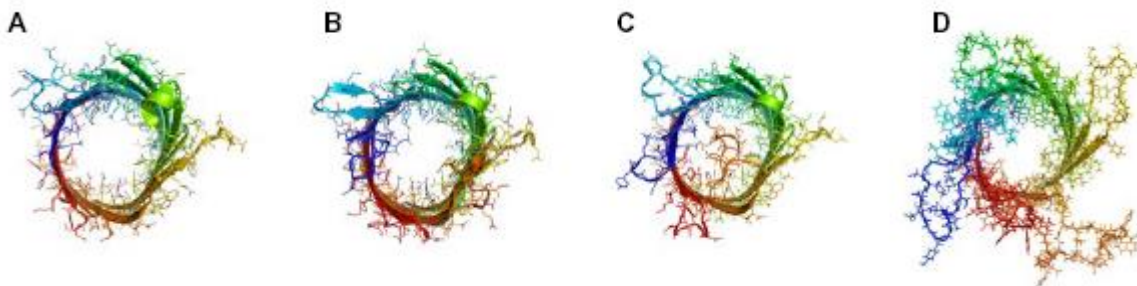
Die substratspezifischen Porine zeichnen sich durch eine Präferenz für eine Substanzklasse oder sogar ein bestimmtes Substrat aus. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist Maltoporin (LamB), welches als ein Maltose-Transporter fungiert. Die Porenöffnung dieses 18-strängigen  $\beta$ -barrels wird durch eine *loop* blockiert. Bindet Maltose in der Bindungstasche nahe des Poreneingangs kommt es zu einer konformellen Änderung und der Durchtritt wird ermöglicht. Im Inneren der Pore gibt es eine Reihe aus sechs aromatischen Resten, die sogenannten *greasy slide*, welche die Energiebarriere für den Durchtritt von Zuckern erniedrigt.<sup>[10, 14]</sup>

Die Klasse der ligandengesteuerten Porine funktioniert ähnlich wie LamB. Hierbei muss ein Botenstoff zuerst an die Pore binden, damit es zu einer konformationellen Änderung kommt und Stoffe durchtreten können. Ein Beispiel hierfür ist das 22-strängige  $\beta$ -barrel FepA, welches für die Aufnahme von Eisenchelaten verantwortlich ist. Da diese Aufnahme allerdings meistens gegen einen starken Konzentrationsgradienten läuft, ist der Transport aktiv und funktioniert nur mit dem Protein TonB, welches die Energie von ATP auf FepA überträgt.<sup>[18]</sup>

### 1.3 Outer Membrane Protein G

Das *Outer Membrane Protein G* (OmpG) gehört zu der Klasse der allgemeinen Porine und liegt, im Gegensatz zu vielen anderen Porinen, in Membranen als Monomer vor.<sup>[19]</sup> Auf der anderen Seite zeigt es aber auch viele Merkmale der Porine: das Fehlen von Cysteinen, die  $\beta$ -barrel-Struktur, den leichten Überschuss an negativ geladenen Aminosäuren, keinen großen hydrophoben Bereich und ein C-terminales Phenylalanin zum Einbau in die Membran.

Mehrere Gruppen haben in den letzten Jahren die Struktur von OmpG durch Kristallographie oder NMR gelöst. Die erste Struktur kam 2006 von *van der Berg et al.* durch eine Kristallstruktur bei pH 5.5.<sup>[19]</sup> Ebenfalls 2006 stellte *Kühlbrandt et al.* eine Kristallstruktur bei pH 7.5 vor, welche die Pore im offenen Zustand zeigt. Zudem lösten sie eine Kristallstruktur bei pH 5.6, welche vergleichbar mit der Struktur von *van der Berg et al.* ist und das Porin im geschlossenen Zustand zeigt. 2007 wurde die dritte Struktur von *Tamm et al.* veröffentlicht. Diese Struktur wurde bei pH 6.5 durch NMR-Spektroskopie gelöst.<sup>[3]</sup> Alle Strukturen zeigen, dass OmpG ein 14-strängiges  $\beta$ -barrel ist. Allerdings zeigt die NMR-Struktur eine rundere Form der Pore im Vergleich mit den Kristallstrukturen. Ob das an den fehlenden Kontakten liegt, die es im Kristall gibt oder an der Qualität des NMR-Datensatzes liegt, konnte bis zum jetzigem Zeitpunkt im Jahre 2013 nicht geklärt werden.<sup>[3]</sup> Die drei Strukturen werden in Abb. 1.4 gezeigt.

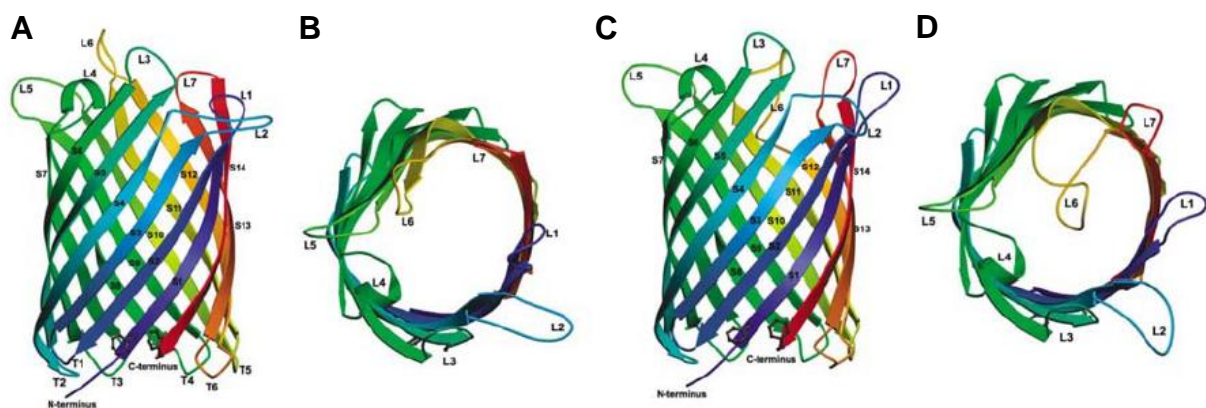


**Abb. 1.4:** Aufsicht auf OmpG der verschiedenen Strukturanalysen. **(A)** *Van den Berg et al.*, (pH 5.5, PDB-Eintrag 2F1C),<sup>[19]</sup> **(B)** *Kühlbrandt et al.* (pH 7.5, offener Zustand) (PDB-Eintrag 2IWW),<sup>[9]</sup> **(C)** *Kühlbrandt et al.* (pH 5.6, geschlossener Zustand), (PDB-Eintrag 2IWV)<sup>[9]</sup> **(D)** *Tamm et al.* (PDB-Eintrag 2JQY).<sup>[3]</sup>

Das Gen von OmpG codiert 301 Aminosäuren, welche eine Signalsequenz von 21 Aminosäuren enthält und beim Export abgespalten wird. Das so erhaltene Porin OmpG besteht aus 280 Aminosäuren mit einer Gesamtmasse von 33.6 kDa.<sup>[9]</sup> Auf der Seite, die dem Periplasma zugewandt ist, sind die Stränge über kleine *turns* verbunden (T1 bis T6). Auf der



extrazellulären sind die Stränge durch lange, flexible Schleifen, den *loops*, verbunden (L1-L7). Der L6-loop wird für das schnelle Öffnen und Schließen des Kanals, das sogenannte *flickering*, verantwortlich gemacht, welches bei Messungen in planaren Lipiddoppelschichten, den *Black Lipid Membrane*-Messungen (BLM-Messungen), erkannt werden kann. Abb. 1.5 zeigt diese Konformationsänderungen bei den verschiedenen pH-Werten. Im sauren Milieu sind die Histidine His231 und His261 protoniert und stoßen sich gegenseitig ab. Dies führt dazu, dass L6 sich über den Poreneingang faltet und damit zum Schließereignis führt. Bei basischen pH-Werten hingegen bilden die beiden Histidine Wasserstoffbrückenbindungen aus und stabilisieren so den *loop* parallel zu der Gefäßwand.<sup>[9]</sup>

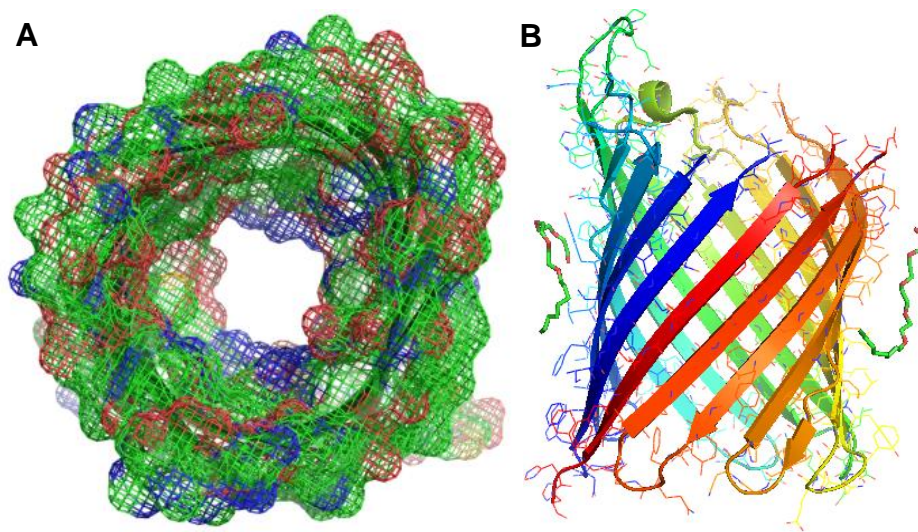


**Abb. 1.5:** (A) OmpG in offener Form, Seitenansicht, (B) OmpG in offener Form, Aufsicht, (C) OmpG in geschlossener Form, Seitenansicht, (D) OmpG in geschlossener Form, Aufsicht.<sup>[9]</sup>

Der größte Durchmesser der Pore wird auf der periplasmaren Seite erreicht. Er beträgt 20 - 22 Å wie in Abb. 1.6 A gezeigt wird. Die engste Stelle befindet sich nahe des aromatischen Gürtels bei der extrazellulären Seite. Diese Restriktionszone wird ausschließlich von drei verschiedenen Aminosäuren gebildet, Tyrosin, Arginin und Glutamat. Dadurch wird eine Porengröße von 15 · 12 Å erreicht. Die Verteilung der Arginin- und Glutamatreste zeigt eine interessante Verteilung, da Cluster derselben Aminosäuren auf den gegenüberliegenden Seiten vorhanden sind. Durch diese Verteilung entsteht ein elektrisches Feld innerhalb der Pore.<sup>[9]</sup>

Der minimale Durchmesser der Pore von OmpG ist im Vergleich zu anderen allgemeinen Porinen ziemlich groß, da begrenzende *loops* fehlen, die hereinragen. So ist zum Beispiel der Porendurchmesser des trimeren OmpFs lediglich nur 7 · 11 Å groß, was an dem begrenzenden *loop* 3 liegt (Abb. 1.3 B). ScrY hingegen wird nicht nur durch den *loop* 3 begrenzt, sondern auch durch *loop* 1 und *loop* 6 am Poreneingang, was den Porendurchmesser auf 8 · 11 Å verringert.<sup>[20]</sup>

OmpG ist aufgrund dieser großen Pore für den Transport von Mono-, Di- und Trisacchariden, sowie für die Aufnahme von Molekülen bis zu 600 Da verantwortlich. Dies wird in *Escherichia coli*, in dem OmpG vorkommt, normalerweise vom Maltoporin LamB erfüllt und nur bei dessen Fehlfunktion wird OmpG exprimiert. Neben der Porengröße teilt sich OmpG noch ein weiteres Merkmal mit LamB, den sogenannten *grease slide*. Dies ist eine Anordnung von aromatischen Aminosäuren innerhalb der Pore, die die Energiebarriere für den Durchtritt für unpolare Stoffe durch den Kanal erhöht.



**Abb. 1.6:** Struktur von OmpG nach *van der Berg* (PDB-Eintrag 2F1C), **A:** Pore in der Aufsicht vom Periplasma aus mit Darstellung der Proteinoberfläche, **B:** Seitenansicht der Pore mit Detergenzmolekülen.

Wie in den Kristallstrukturen zu erkennen ist, liegt OmpG, im Gegensatz zu vielen anderen Porinen, als Monomer vor und ist als solches in der Zellmembran aktiv. BLM-Messungen sprechen stark gegen die Möglichkeit, dass OmpG ein Oligomer ist, da nur konzertierte Öffnungs- und Schließvorgänge bei Ein-Kanal-Messungen zu beobachten waren.<sup>[21]</sup> Weiterhin zeigt die NMR-Strukturaufklärung von *Tamm et al.*, welche in Lösung stattfand, auch keine Hinweise auf oligomere Strukturen. Als letzten Hinweis sind die Kristallstrukturen zu betrachten. Hier gibt es in den sechs in der PDB hinterlegten Kristallstrukturen sehr unterschiedliche Anordnungen der Monomere. Zwar konnte gezeigt werden, dass in allen Kristallstrukturen Interaktionen zwischen den Flächen im Transmembranbereich existieren,<sup>[19]</sup> da diese Kontakte aber nur bei antiparalleler Anordnung zustande kommen, spricht dies auch für Monomere in Membranen.

OmpG ist gegen verschiedene denaturierende Agenzien wie SDS, Hitze und Proteasen längere Zeit stabil. Dies ist, wie bei anderen Porinen, auf die stabile  $\beta$ -barrel-Struktur

---

zurückzuführen. Die Serinprotease K zum Beispiel kann OmpG im gefalteten Zustand lange Zeit widerstehen.<sup>[21]</sup>

Wegen der monomeren Struktur und großen Robustheit bietet sich OmpG als Basis für Biohybride, eine Kombination aus einem bioaktiven Teil wie einer Pore und einer strukturellen Komponente, an. Im Vergleich zu oligomeren Porinen wie  $\alpha$ -Hämolysin oder OmpF muss hier nur eine Einheit modifiziert werden und Mischungen können ausgeschlossen werden.

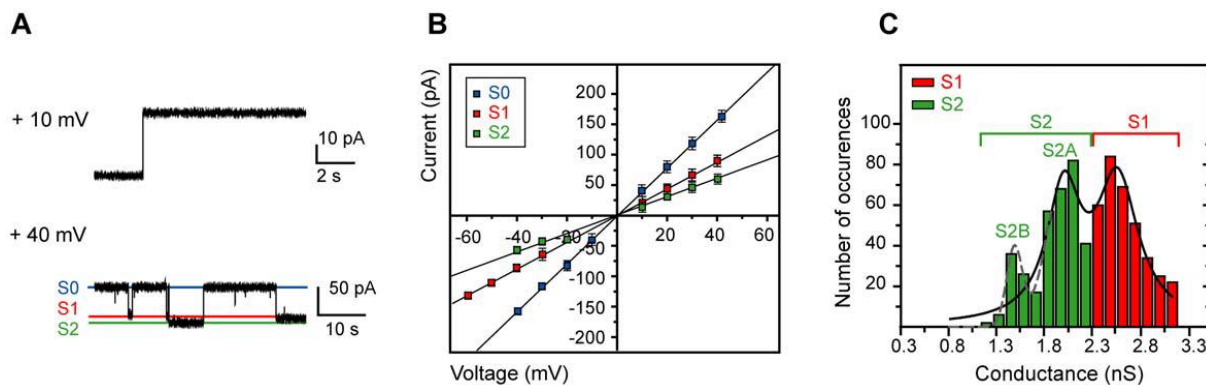
## **1.4 Voltage-dependent anion channel**

Der *voltage-dependent anion channel* (VDAC) ist ein in der Literatur viel diskutiertes Porenprotein. VDAC kommt vorwiegend in der äußeren Membran der Mitochondrien vor und ist dort für den Transport von Ionen sowie die Aufnahme und Abgabe von Metaboliten, ATP, ADP und Cofaktoren bis zu einer Masse von 5 kDa zwischen *inter membrane space* und Cytosol verantwortlich. Ebenso soll VDAC in der Lage sein lineare DNA-Stränge zu transportieren.<sup>[25]</sup> Neuere Forschungen zeigen, dass VDACs auch in der äußeren Zellwand von Eukaryoten vorkommen können.<sup>[26]</sup>

Der *voltage-dependent anion channel* hat seinen Name durch die ersten *black lipid membrane*-Messungen bekommen, die mit dem Protein durchgeführt wurden. Es wurde ein starkes *voltage-gating* festgestellt. Der Kanal befindet sich bis zu einer angelegten Spannung von ungefähr  $\pm 30$  mV im offenen Zustand, wobei das Membranpotential von Mitochondrien bei unter -100 mV liegt. Er weist eine Anionenselektivität auf und ist durchlässig für größere Metabolite. Die Leitfähigkeit beträgt ungefähr 4 nS. Sobald sich die Spannung über +30 mV oder unter -30 mV ändert geht der Kanal in einen partiell geschlossenen Zustand über. Hierbei weist er eine Kationenselektivität auf und der Durchfluss von Metaboliten wird stark eingeschränkt. Die Leitfähigkeit sinkt auf circa 2 nS.<sup>[27, 28, 29]</sup> Neuer Ergebnisse zeigen, dass VDAC neben dem offenen Zustand zwei gut definierte partiell geschlossene Zustände besitzt.<sup>[30]</sup> Abb. 1.7C zeigt die Häufigkeit der Leitfähigkeiten im partiell geschlossenen Zustand. Die Summe zweier Gauß-Verteilungen passte besser zu den erhaltenen Daten als eine Gauß-Verteilung und sorgte für die Identifizierung der Zustände S1 und S2. Der Leitfähigkeitswert für den Zustand S2 ( $1.90 \pm 0.06$  nS,  $n=294$ ) stimmt mit bis dahin erhaltenen Werten für VDAC-Schließereignisse überein.<sup>[31]</sup> Die biochemische Rolle der Zustände S1 und



S2 ist noch nicht vollständig geklärt, allerdings spielt die N-terminale  $\alpha$ -Helix eine entscheidende Rolle bei dem Schließverhalten.



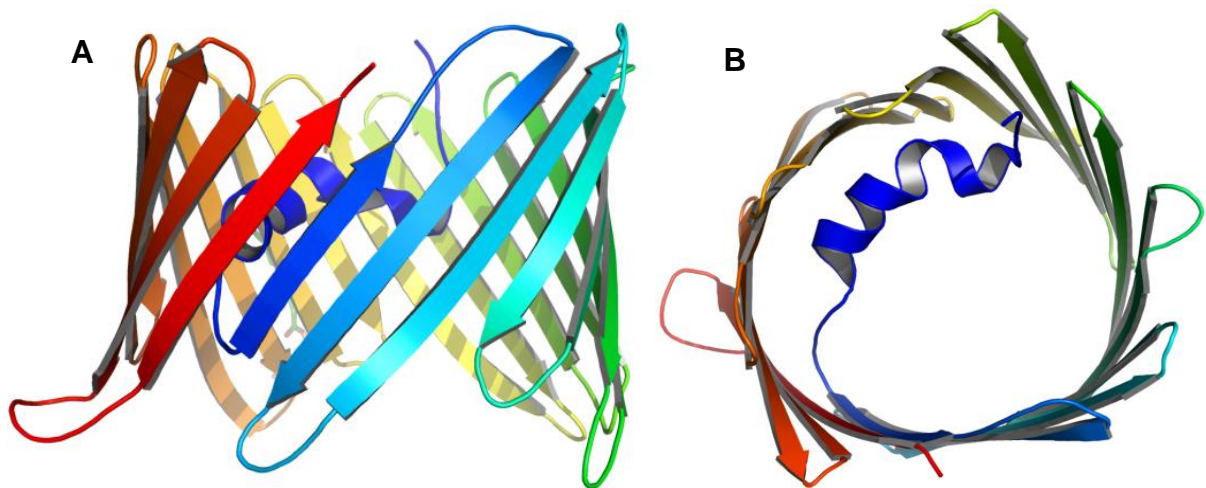
**Abb. 1.7:** Schaltverhalten von mVDAC-1. **A)** Repräsentative BLM-Spuren von mVDAC-1 bei +10 und +40 mV. Die beobachteten Zustände S0, S1 und S2 sind bei der +40 mV-Spur in blau, rot beziehungsweise grün dargestellt. **B)** Ohm-Plot zur Ermittlung der Leitfähigkeit der einzelnen Zustände (S0: offener Zustand,  $3.94 \pm 0.04$  nS,  $n=680$ ; S1: geschlossener Zustand,  $2.61 \pm 0.01$  nS,  $n=386$ ; S2: geschlossener Zustand,  $1.90 \pm 0.06$  nS,  $n=294$ ). **C)** Histogramm der Häufigkeiten der niedrigen Leitfähigkeitswerte. Die Verteilung der Zustände kann gut mit der Summe zweier Gauß-Verteilungen wiedergegeben werden. Dies spricht für die beiden, geschlossenen Zustände S1 (rot) und S2 (grün).

VDAC ist maßgeblich an der Zelloptose beteiligt, wobei dessen genaue Rolle noch unklar ist. In der Literatur werden und wurden drei unterschiedliche Modelle diskutiert: 1.) VDAC ist Teil der *mitochondrial permeability transition pore*, ein sehr diskutierte und undefinierter Porenkomplex, und sorgt durch Cytochrom C durch das anschwellen und Platzen der Mitochondrienmembran. Dieses Modell scheint aber fehlerhaft zu sein, da Mitochondrien, denen VDAC fehlt, ein normales Verhalten der Membrandurchlässigkeit als Reaktion auf schädliche Stimuli zeigen. 2.) VDAC bildet mit Homo- oder Heterooligomere (mit Bax/Bak) aus, wodurch große Poren gebildet werden, welche Cytochrom C freilassen können. Dieses Modell ist ebenfalls fraglich, da Zellen frei von jeglichen VDAC-Isoformen einen erhöhten Zelltod als Reaktion zu apoptischen Stimuli aufweisen. 3.) VDAC wird durch diverse anti-apoptotischen Reagenzien im geöffneten Zustand gehalten, wodurch die Membrandurchlässigkeit erhalten bleibt. Andererseits finden sich immer mehr pro-apoptotische Modulatoren, die VDAC schließen, den Adeninnucleotid-Austausch inhibieren und zum Zelltod führen.<sup>[32]</sup>

Es gibt in der Literatur zwei unterschiedliche Vorstellungen der tertiären Struktur von VDAC, die auf verschiedenen Messmethoden und Theorien aufgebaut sind: eine Struktur aufgrund von Funktionsmessungen von VDAC, die von *Colombini et al.* stark vertreten wird und eine

---

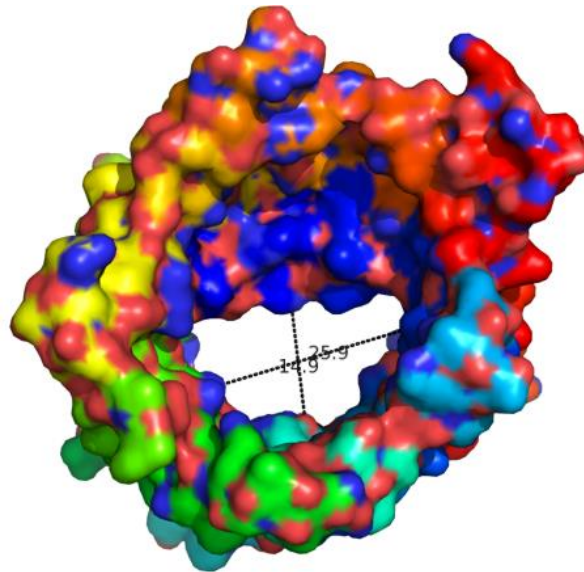
Struktur, die durch NMR, Röntgenstrukturanalyse und einer Kombination aus beiden begründet wird. In einigen Punkten sind sich beide Theorien jedoch einig: VDAC besitzt (größtenteils) eine  $\beta$ -barrel-Struktur, wie sie bei Porinen häufig anzutreffen ist, besteht aus ungefähr 283 Aminosäuren, ist circa 30 kDa schwer und im nicht apoptotischen Zustand ist VDAC als Monomer aktiv.



**Abb. 1.8:** VDAC-1 aus *mus musculus* nach der Kristallstruktur von Bayrhuber *et al.*, **A:** mVDAC-1 in der Seitenansicht. Gut zu erkennen Strang  $\beta 1$  und  $\beta 19$ , welche parallel zueinander sind, **B:** mVDAC-1 in der Aufsicht auf die Pore, die N-terminale  $\alpha$ -Helix verengt die Pore auf 24-28 Å.<sup>[30]</sup> (PDB-Eintrag: 3EMN).

Die NMR-/Röntgenstruktur wurde 2008 von drei Gruppen fast zeitgleich und unabhängig voneinander veröffentlicht.<sup>[31, 33, 34]</sup> Abb. 1.8 zeigt die Struktur von Bayrhuber *et al.*, welche eine Röntgenstrukturanalyse mit einer Auflösung von 2.3 Å ist. Hiller *et al.* hat eine rein auf NMR-Daten basierte Struktur veröffentlicht und Ujwal *et al.* kombinierte eine dreidimensionale Röntgenstrukturanalyse mit NMR-Aufklärung. Alle drei Strukturen zeigen den gleichen 19-strängigen  $\beta$ -barrel-Grundkörper der Pore, in dessen Porenöffnung sich die N-terminale  $\alpha$ -Helix, bestehend aus 25 Aminosäuren, befindet. Der RMSD über die 171 C $^{\alpha}$  Atome ergibt 1.5 Å.<sup>[35]</sup>

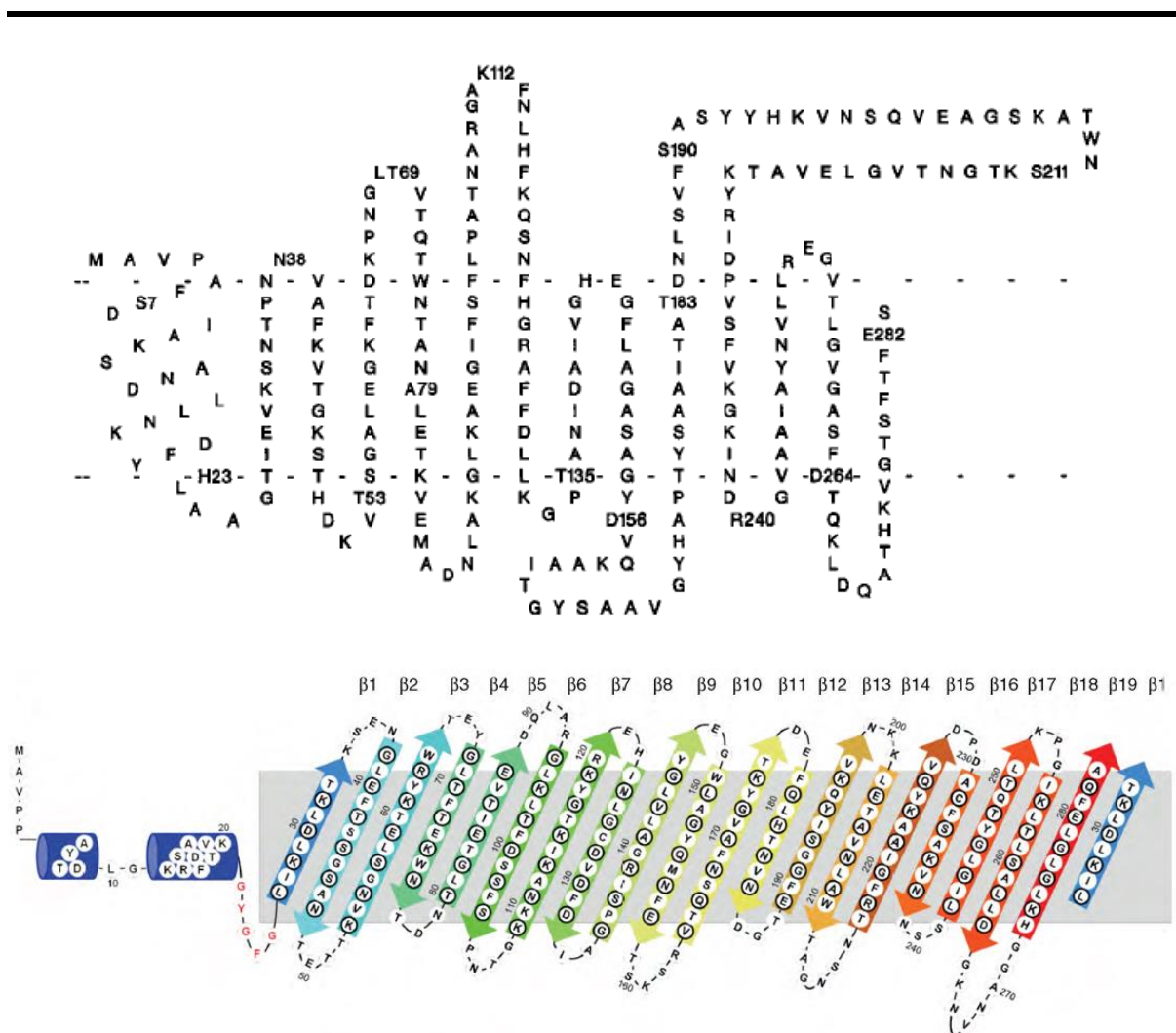
Diese Strukturen zeigen eine völlig neue Art von Porin. Die Anzahl der Stränge ist ungerade und die Stränge  $\beta 1$  und  $\beta 19$  sind parallel zueinander angeordnet. Da bei Porinen im Allgemeinen alle  $\beta$ -Stränge antiparallel angeordnet sind und es eine gerade Anzahl gibt, hat VDAC eine strukturelle Sonderrolle. Die parallele Anordnung ist in Abb. 1.8 zu erkennen. Der Porendurchmesser von Wand zu Wand beträgt 34 – 38 Å. Der Innendurchmesser beträgt allerdings nur 15 · 26 Å, da die in die Pore reichende  $\alpha$ -Helix den realen Porendurchmesser mindert (Abb. 1.9).



**Abb. 1.9:** Minimaler Poreninnendurchmesser von VDAC an Hand der Kristallstruktur von *Bayrhuber et al.*: 14.9 Å zwischen K12 und E59, 25.9 Å zwischen K115 und T258.

Eine weitere Auffälligkeit ist die polare Aminosäure Glutamat 73. E73 liegt auf der hydrophoben Außenseite der Pore und ist im hydrophoben Teil der Membran lokalisiert. Die Gruppe von De Pinto hatte Jahre zuvor schon Versuche mit DCC, welches nur mit Carbonsäuren in extrem hydrophoben Umgebungen reagiert, durchgeführt und verschiedene Porine untersucht. Unter anderem reagierte VDAC und über Verdau sowie anschließender Massenspektrometrie konnten sie auch darlegen, dass E73 reagiert hatte.<sup>[36]</sup>

Die zweite strukturelle Auffassung von VDAC beruht vorwiegend auf Methoden der strukturellen Charakterisierung. Dazu gehörten zum Beispiel Circular dichroismus-Spektrometrie um das Helix zu Faltblatt Verhältnis zu bestimmen<sup>[37]</sup>, Messungen des Neigungswinkels der  $\beta$ -Stränge<sup>[38]</sup>, Messung des Porendurchmessers<sup>[39]</sup>, Bestimmung der für Proteasen zugänglichen Stellen<sup>[40]</sup> und noch einige mehr.<sup>[41]</sup> Aus diesen Daten ergibt sich, dass VDAC aus 13  $\beta$ -Faltblättern besteht und eine  $\alpha$ -Helix mit in der Porenwand enthalten ist. Die Faltblätter sind um  $46^\circ$  geneigt, was einen Innendurchmesser der Pore von 25 Å zur Folge hat. Die Aminosäuren innerhalb der Pore sind so angeordnet, dass sich vorwiegend negative und positive Ladungen gegenüber stehen und somit ein elektrisches Feld bilden. Abb. 1.10A zeigt den vorgeschlagenen Aufbau von VDAC nach *Colombini*.<sup>[35]</sup>



**Abb. 1.10:** Sequenzdarstellung von VDAC mit Verdeutlichung der  $\beta$ -Stränge, *loops*, *turns* und der  $\alpha$ -Helix. **A:** Modell von *Colombini et al.*, VDAC besteht aus 13  $\beta$ -Strängen und einer porenbildenden  $\alpha$ -Helix, **B:** Modell abgeleitet aus NMR und Kristallstruktur, 19  $\beta$ -Strängen und  $\alpha$ -Helix befindet sich innerhalb der Pore.<sup>[35]</sup>

Jedoch kann diese von *Colombini* vorgeschlagene Struktur nicht schlüssig das Schaltverhalten von VDAC erklären. Um Dieses aufzuklären wurden von mehreren Arbeitsgruppen Mutation von VDAC hergestellt, deren strukturelle Änderungen auf Grundlage der Röntgenkristallstruktur beruhten. BLM-Messungen von Mutanten, in denen die  $\alpha$ -Helix fehlt, zeigen, dass das Schaltverhalten reduziert ist oder sogar ganz fehlt.<sup>[42, 43]</sup> *Mertins et al.* führten Cystein-Cystein-Disulfidbrücken an verschiedene Stellen zwischen der  $\alpha$ -Helix und der Porenwand ein, welche die Beweglichkeit der  $\alpha$ -Helix einschränkten. In anschließenden Leitfähigkeitsmessungen konnte gezeigt werden, dass diese Mutanten ein stark verändertes Schaltverhalten aufweisen.<sup>[30]</sup> Diese Daten belegen zum einen, dass die  $\alpha$ -Helix essentiell für das Schaltverhalten sein muss und zum anderen, dass die durch Röntgenkristallographie erhaltene Struktur auch die biologisch relevante Struktur ist.<sup>[30]</sup>

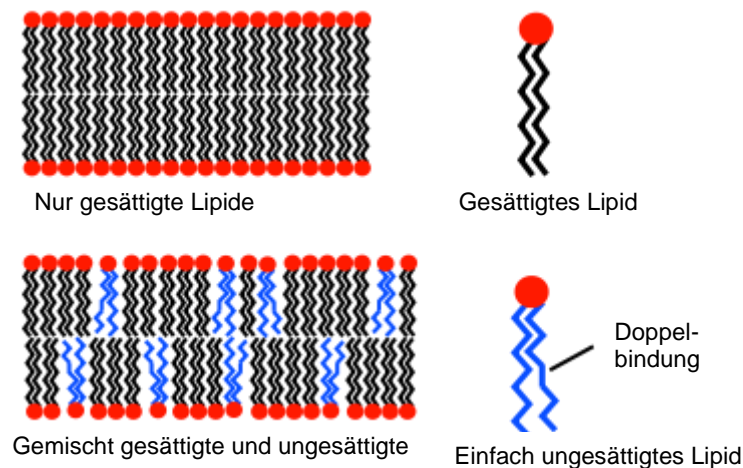
VDACs von unterschiedlichen Spezies wie zum Beispiel von Säugetieren, Pilzen oder Pflanzen haben eine sehr geringe Sequenzidentität (<5%). Hingegen zeigen sie alle eine ähnliches grundsätzliches Schaltverhalten eines geöffneten Zustands hoher Leitfähigkeit und hohem Metabolitenfluss und einem geschlossenen Zustand geringer Leitfähigkeit und einem geringen Metabolitenflusses. Weiterhin ist über die Spezies gemein, dass es in der Aminosäuresequenz große Bereiche alternierend wechselnder polarer und unpolarer Aminosäuren gibt, wie es für  $\beta$ -Barrels typisch ist, und einige Sequenzen sind im N- und C-Terminus über die Spezies erhalten geblieben.<sup>[44]</sup> Bei entfernt verwandten Spezies finden sich hingegen auch große Gemeinsamkeiten bei den VDAC-Isoformen, wie zum Beispiel zwischen Hefe und menschlichem VDAC-1 (283 Aminosäuren, strukturelle Ähnlichkeit bzw. Übereinstimmung von 67% bzw. 24%).<sup>[35]</sup> So unterscheidet sich VDAC-1 vom Menschen in nur vier Aminosäuren von VDAC-1 der Maus.

## **1.5 Black lipid membranes**

Biologische Systeme sind hoch komplex und dadurch in vielen Belangen schwer zu untersuchen. Um diese Systeme zu vereinfachen und um Membranen und vor allem Membranproteine auf ihre elektrochemischen Eigenschaften untersuchen zu können, werden die *black lipid membranes*, auch BLMs genannt, verwendet.

BLMs sind künstliche Lipiddoppelschichten, deren Zusammensetzung variieren kann. So kann die Schicht entweder nur aus Lipiden bestehen oder Additive enthalten, die für eine erhöhte Mobilität der Lipide in der Schicht sorgen. Zu den gängigen Additiven gehört zum Beispiel Cholesterin, welches auch in der Membran von tierischen Zellen vorkommt.<sup>[24]</sup> Sie wurden vor mittlerweile 50 Jahren von *Mueller et al.* eingeführt und haben seit dem stark zum Verständnis von Biomembranen beigetragen.<sup>[45, 46]</sup>





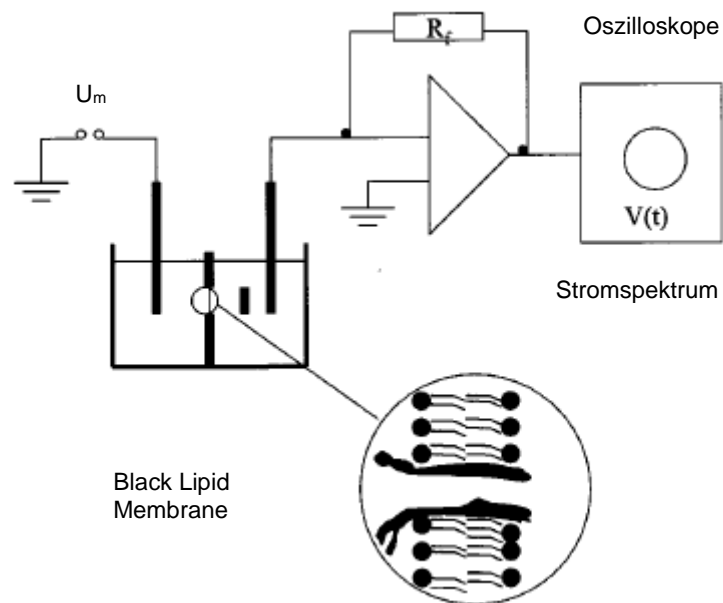
**Abb. 1.11:** Beispielhafte Darstellungen von Lipiddoppelschichten wie sie in BLM Messungen vorkommen.<sup>[47]</sup> Zusatz von ungesättigten Fettsäuren erhöht die Fluidität innerhalb der Doppelschicht.

BLMs haben gegenüber anderen Systemen wie Lipid-Vesikeln den Vorteil, dass nur sehr geringe Mengen an Lipid benötigt werden. Die Membran wird üblicherweise über eine hydrophobe, meistens aus Teflon bestehende, kreisrunde Öffnung mit bis zu einigen Millimetern Durchmesser gespannt. Diese Apertur trennt zwei mit Puffer gefüllte Kammern voneinander. Die entstandene, nur vier bis sechs Nanometer dicke Membran ist in der Lage eine Fläche von mehreren Quadratmillimetern freischwebend zu überspannen und hat dabei bessere isolatorische Eigenschaften als eine entsprechende Schicht aus Porzellan. Auf Grund der Größe ist es möglich Messungen an dieser planaren Lipidschicht zu unternehmen mit vernachlässigbar kleinen Randeffekten. Allerdings wird aufgrund dieser Ausdehnung die Membran nur von sehr kleinen lateralen Spannungen gehalten, was zu Rissen in der Membran bei Erschütterungen führt.

Es gibt zwei Methoden zum Aufbau von BLMs. Die erste ist die lösungsmittelhaltige Methode nach *Rudin* und *Müller*. Hierbei wird das Lipid in einem Lösungsmittel (meistens Decan) gelöst und mit einem Pinsel auf der zu überspannenden Apertur aufgetragen. Der aufgetragene Film enthält zuerst noch Lösungsmittel, verdünnt sich dann aber spontan unter Abgabe des Lösungsmittels. Dieser Vorgang kann durch ein Lichtmikroskop beobachtet werden. Sobald sich die Membran verdünnt und unter eine gewisse Dicke kommt, erscheinen farbige Reflexe wie in einer Seifenblase. Die Membran wird dünner und mehr Reflexe entstehen, die ersten schwarzen Stellen auftauchen bis die komplette Membran schwarz erscheint. Dies führte zum Namen *black lipid membrane* und liegt an der destruktiven Interferenz der beiden Lichtstrahlen, die an den Grenzflächen Wasser/Lipid und Lipid/Wasser reflektiert wird. Die Überlagerung der beiden Lichtwellen wird destruktiv, sobald der

Lichtweg durch die Membran und zurück vernachlässigbar klein wird im Vergleich zur Wellenlänge des Lichts, folglich muss sich eine Doppelschicht gebildet haben.

Diese BLMs haben meistens aufgrund der enthaltenen Lösungsmittelmoleküle eine höhere Fluidität als die Membranen, die nach der zweiten Methode nach *Montal* und *Müller* hergestellt werden.



**Abb. 1.12:** Schema eines Standes für BLM-Messungen. Auf der sogenannten *cis*-Seite wird eine Spannung  $U_m$  angelegt. Der Stromfluss durch die Membran oder Ionenkanal wird durch einen Strom-Spannungs-Verstärker detektiert.  $R_f$  ist ein Feedback Widerstand und bestimmt die Verstärkung. Das verstärkte Signal  $V(t)$  wird weiter für eine Ausgabe aufgearbeitet, z.B. durch ein Computerprogramm.<sup>[26]</sup>

Die Methode nach *Montal* und *Müller* wird auch lösungsmittelfreie Methode genannt. Hierbei wird das Lipid meistens in einem Gemisch aus Chloroform und Decan gelöst und auf die Pufferlösung in einer Kammer gegeben. Es wird etwas gewartet bis das Lösungsmittel verdunstet ist und anschließend wird der Pufferstand unterhalb des Apertus langsam gesenkt. Hierbei bildet sich die erste Monoschicht aus. Durch langsames Erhöhen des Pufferstandes wird dann die Doppelschicht vervollständigt. Die Vorteile hierbei sind zum Einen ein viel geringerer Lösungsanteil in der Membran und zum Anderen dass unsymmetrische Membranen generiert werden können, welche in der Natur sehr häufig vorkommen.<sup>[48]</sup>

BLM sind nahezu perfekte Isolatoren mit spezifischen Kapazitäten  $C_m$  zwischen  $1.5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  und  $0.3 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ . Große Werte für  $C_m$  stehen für Membranen ohne Lösungsmittel, deren Ausdehnungen gering sind, wohingegen kleine Werte für sehr lösungsmittelhaltige Membranen stehen, die über große Aperturen gespannt sind. Da schon kleine Störungen in der

---

Membran, wie zum Beispiel eine Insertion von Porenproteinen, einen starken Anstieg in der Leitfähigkeit zur Folge haben, eignen sich BLMs hervorragend um membranaktive Substanzen zu untersuchen. Ein schematischer Aufbau einer solchen Messanordnung wird in Abb. 1.12 gezeigt.

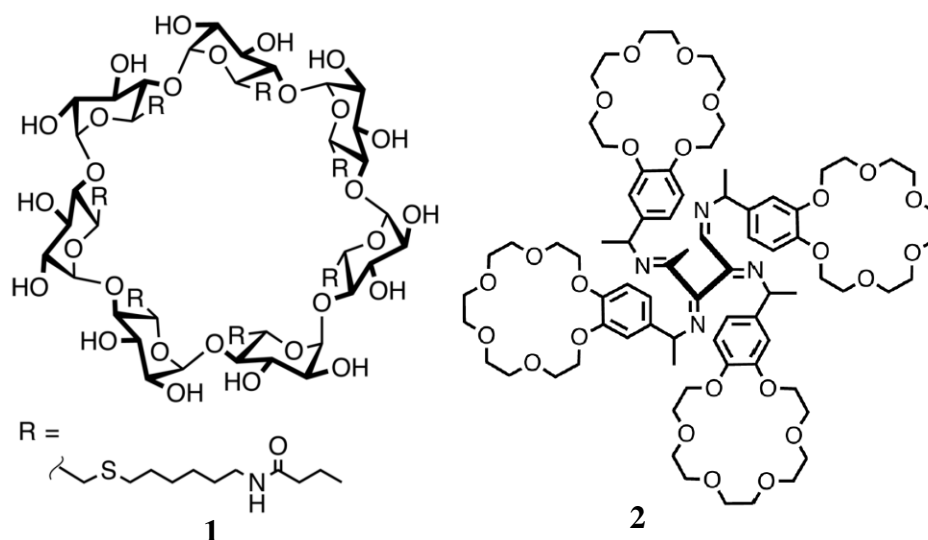
Die Vorteile, die bei solch einer Versuchsanordnung bei Einkanal-Messungen erreicht werden, sind, dass der Einbau von Membranproteinen in die planare Doppelschicht sterisch nicht gehindert ist und der Zugang zu beiden Seiten der Membran gewährleistet ist, wodurch asymmetrische Messungen möglich werden. Die Stabilität der Membranen, die nur ein paar Stunden beträgt, ermöglicht auch Messungen über einen längeren Zeitraum. Dadurch können zum Beispiel bei Porinen mehrere Öffnungs- und Schließvorgänge beobachtet werden.

## **1.6 Synthetische Ionenkanäle**

Die Forschung auf dem Gebiet der synthetischen Ionenkanäle wird schon seit nunmehr fast drei Dekaden mit immer neuen Innovationen vorangetrieben in der Hoffnung Zugang zu neuen therapeutischen Methoden und Einzelmolekül-Detektionstechniken zu erhalten. In diesem Abschnitt sollen chronologisch die wichtigsten Entwicklungen auf diesem Gebiet beleuchtet werden. Als synthetische Ionenkanäle werden hierbei Verbindungen gezählt, die (a) nicht biologische vorkommende Einheiten enthalten und (b) in Lipiddoppelschichten aktiv sind. Damit sind *de novo* Peptide, Naturstoffe und modifizierte Membranproteine von dieser Definition ausgeschlossen und werden teilweise, was die Membranproteine betrifft, im nächsten Abschnitt diskutiert.

Die ersten Schritte im auf dem Gebiet der synthetischen Ionenkanäle wurden von *Tabushi et al.* vor fast genau 30 Jahren gemacht.<sup>[49]</sup> Es wurde entdeckt, dass das amphiphile  $\beta$ -Cyclodextrin **1** einen aktiven Kanal in Lipiddoppelschichten bildet (Schema 1). Die vorgeschlagene, aktive Struktur bildet hierbei ein Dimer, welches allgemein als der erste synthetische Ionenkanal gesehen wird. Zwei Jahre später, 1984, wurde von *Nolte et al.* ein synthetischer Ionenkanal auf der Basis von Kronenethern veröffentlicht. Diese Kronenether sind entlang eines helikalen Polyisocyanat-Backbones angeordnet (Verbindung **2**) und generieren Kationenfluß durch Membranen entlang der übereinanderliegenden Kronenether (Schema 1).<sup>[50]</sup> Dies war der erste Ionenkanal, der Kronenether als essentielles Strukturelement besaß.

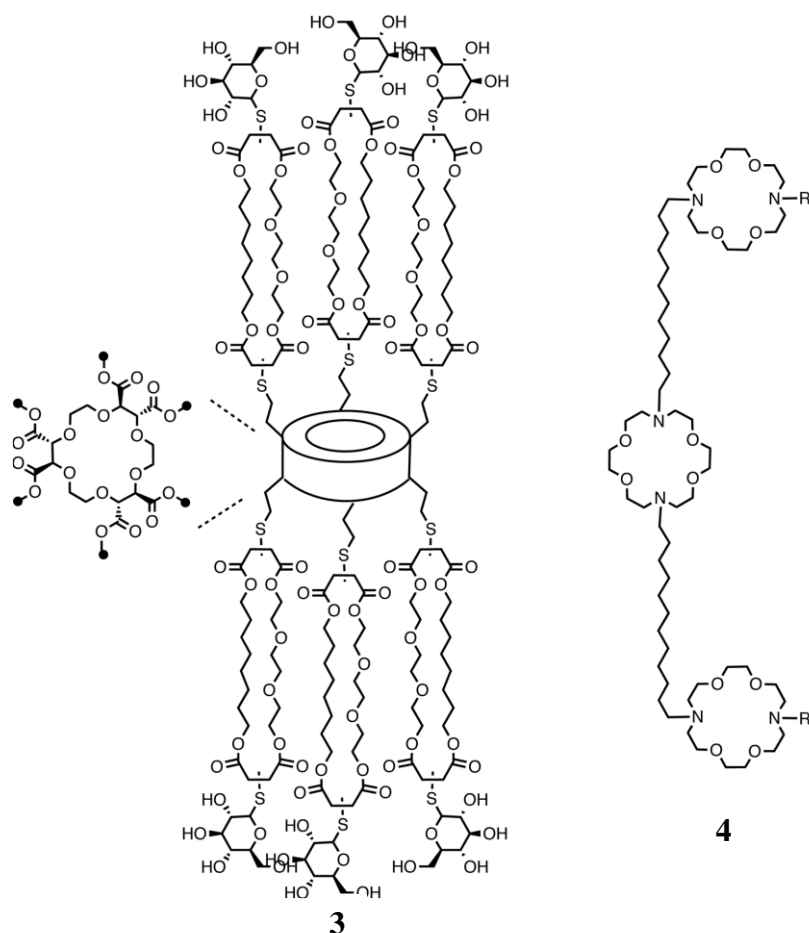




**Schema 1:** Einige der ersten Beispiele für synthetische Ionenkanäle.

Kronenether blieben in den frühen Jahren der synthetischen Ionenkanäle ein dominantes Motiv. 1989 veröffentlichten *Fyles et al.* Verbindung **3**. Jeweils drei amphiphile Makrozyklen sind an beiden Seiten einer zentralen Krone kovalent gebunden um einen hydrophilen Kanal durch die Membran zu bilden. Als Anker dienen Zucker an den Enden der Makrozyklen um den Kanal in der ausgedehnten Konformation zu stabilisieren (Schema 2).<sup>[51]</sup>

Ein Jahr später publizierte *G. Gokel* den ersten Ionenkanal bestehend nur aus Kronenethern.<sup>[52]</sup> Kronentrimer **4** ist äußerst einfach aufgebaut, zeigt aber trotzdem alle nötigen funktionellen sowie strukturellen Eigenschaften, um als vollwertiger Ionenkanal zu gelten (Schema 2). An diesem System wurden weitreichende Studien bezüglich Kronengröße, Alkylkettenlänge, des Restes R sowie diverse funktionelle Messungen gemacht. Dieser Ionenkanal sticht durch seine Simplizität hervor und ist eines der beeindruckendsten frühen Beispiele dieser Klasse.

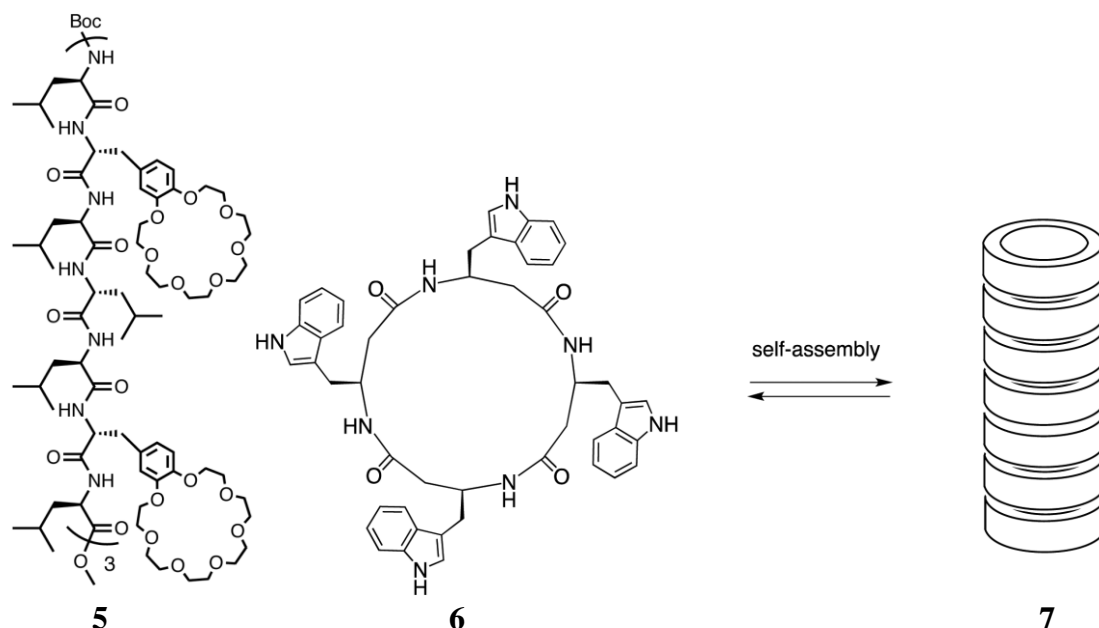


**Schema 2:** Ionenkanäle von *Fyles et. al.*<sup>[51]</sup> und *Gogel et al.*<sup>[52]</sup>

Ein weiterer Ansatz zur Herstellung von Ionenkanälen mit Hilfe von Kronenethern wurde von *Voyer et al.* 1995 unternommen.<sup>[53]</sup> Hierzu wurden die Kronen entlang einer  $\alpha$ -helicalen Grundstruktur angeordnet. Das Peptid **5** besteht aus mehreren Sequenzen von drei hydrophoben Leucinen und einem mit einer Krone modifiziertem Phenylalanin. Die Faltung zu einer  $\alpha$ -Helix, die die Membran durchspannt, sorgt dafür, dass die Kronen übereinander auf einer Seite zu liegen kommen. Die Leitfähigkeit entsteht dadurch, dass Kationen von einer Krone zur nächsten durch die Lipiddoppelschicht springen können. Diese Veröffentlichung zeigt, wie sich in der Natur vorkommende Strukturmotiv mit synthetischen Bausteinen verknüpfen lassen um neue, funktionale Ionenkanäle zu erhalten.

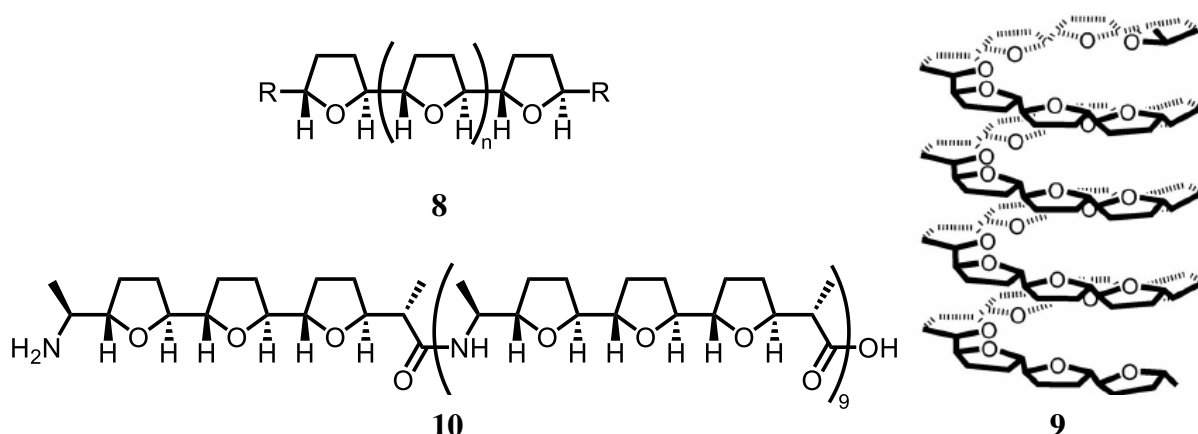
Ein Jahr zuvor wurde in der Arbeitsgruppe von *R. M. Ghadiri* ein Ionenkanal auf Grundlage von  $\beta$ -Aminosäuren hergestellt.<sup>[54]</sup> Die Grundeinheit **6** besteht aus vier  $\beta$ -Tryptophanen, die einen Makrozyklus bilden. In einer Membran ordnen sich mehrere dieser Moleküle selbständig an, um eine  $\beta$ -Helix zu imitieren (Schema 3). Bei dieser Nanoröhre **7** zeigen die aromatischen Reste alle nach außen, um mit der unpolaren Membran zu interagieren. Das Innere der Pore ist frei von funktionellen Gruppen, was nur die freien Ionenpaare der

Backbone-Carbonyle zum Wechselwirken mit Ionen übrig lässt. Dies ist eins der ersten Beispiele, das eine  $\beta$ -barrel-Struktur imitiert.



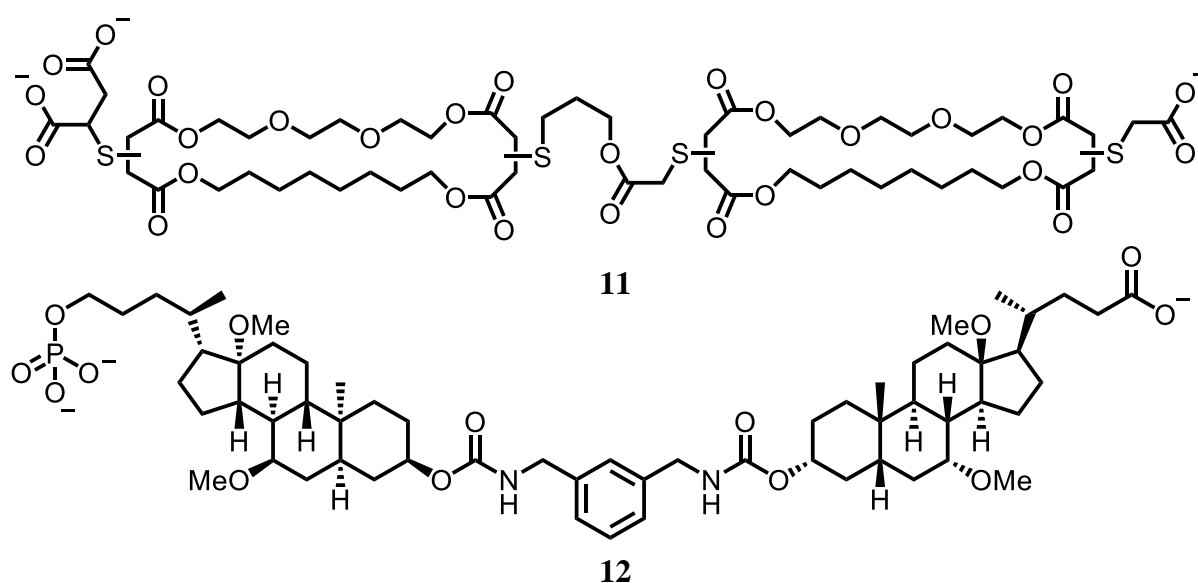
**Schema 3:** Das ionenkanalbildende Peptid **5** von *Voyer et al.* und der Makrozyklus **6** und die sich daraus bildende Nanoröhre **7** von *Ghadiri et al.*

Im selben Jahr wurden von *Koert et al.* die ersten Versuche zur Herstellung von Ionenkanal-Mimikry auf Basis von *trans*-Oligotetrahydrofuranen **8** publiziert (Schema 4). Ziel war es Zugang zu einer Polyether-Struktur des Typs **9** zu erhalten.<sup>[55]</sup> Es wurden diverse Wege gezeigt Mono- bis Pentatetrahydrofurane zu synthetisieren, welche aber alle zu klein waren um eine Lipiddoppelschicht zu durchdringen.<sup>[56-58]</sup> Um noch größere Oligomere zu erhalten wurden Oligo-THF-Peptide eingeführt, welche schließlich zu dem Decamer **10** führten.<sup>[59, 60]</sup> Hiermit wurde ein weiteres, erfolgreiches Polyether-Motiv für Ionenkanäle entwickelt, welches vor allem wegen der synthetischen Leistung hervorsteicht.



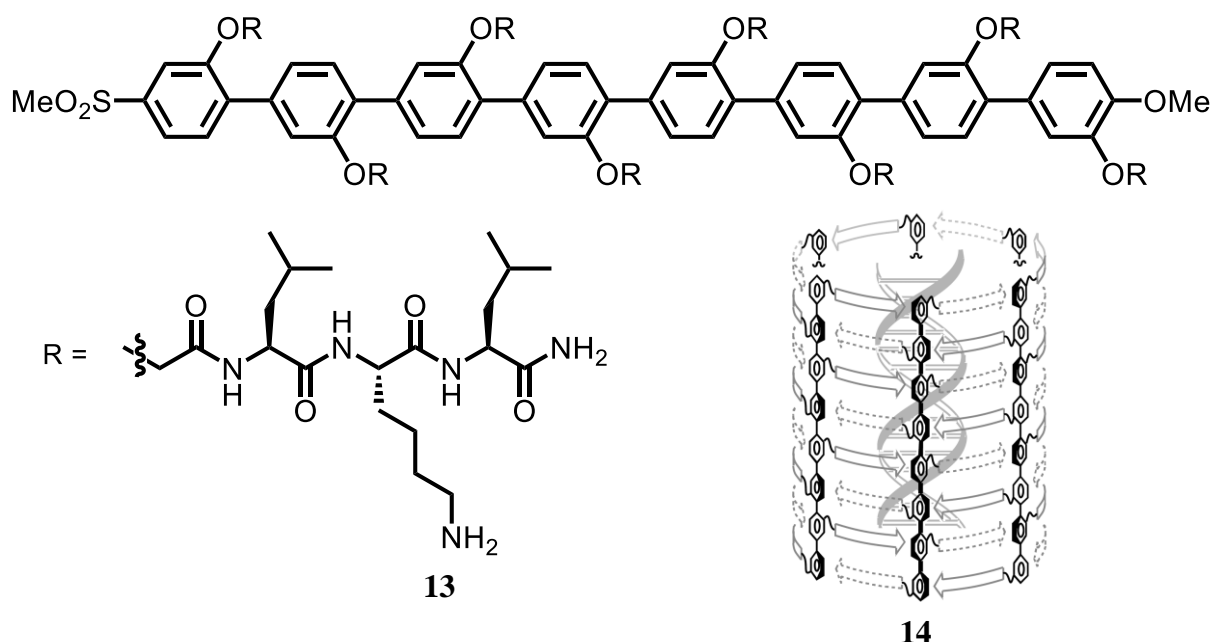
**Schema 4:** Ionenkanäle auf Basis von Oligo-THFs.

Einer der ersten durch Spannung schaltbaren, synthetischen Kanäle wurde 1998 von *Fyles et al.* synthetisiert.<sup>[61]</sup> Dieser ähnelt Verbindung **3**, in dem die zentrale Krone entfernt und durch einen Linker ersetzt wurde (Schema 5). Die für einen Kanal mit *voltage-gating* benötigte Asymmetrie wurde über eine negative Ladung am einen Ende und zwei negativen Ladungen am Anderen erreicht. Verbindung **11** bildet in einer Membran ein Oligomer, welches trotz des geringen Ladungsunterschieds ein starkes *voltage-gating* aufweist. Ein ähnlicher Ansatz von *Kobuke et al.* basierte auf dem Kombinieren von zwei amphiphilen Cholate-Molekülen mit zwei unterschiedlich geladenen Endgruppen (Schema 5).<sup>[62]</sup> Ein asymmetrischer Einbau in eine Membran von Verbindung **12** wurde durch Anlegen einer Spannung während des Membranaufbau- bzw. Einbau-Prozesses erreicht.



**Schema 5:** Verbindungen **11** und **12**, die spannungsabhängige Ionenkanäle bilden.

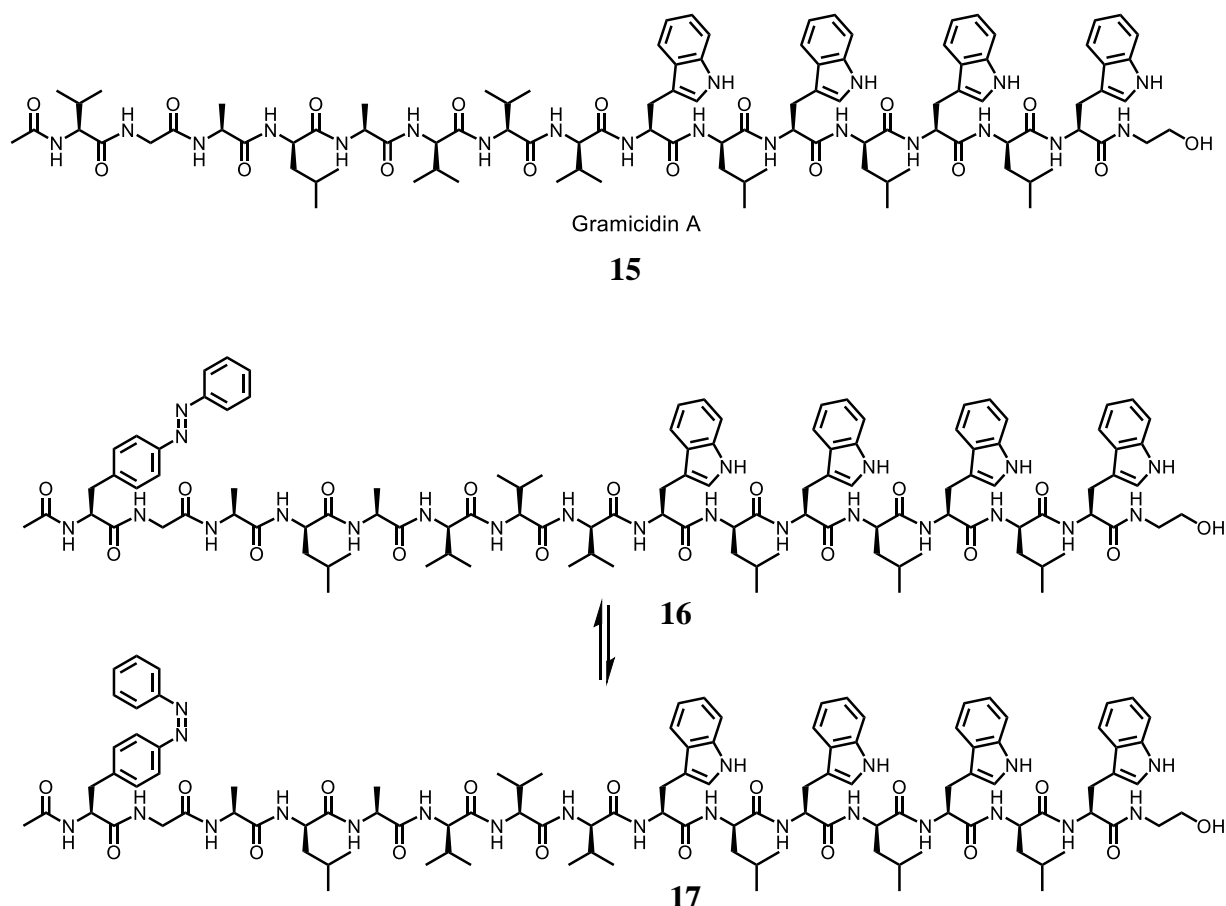
Von *Matile et al.* wurde ein anderer Weg im Jahre 1999 publiziert, wodurch es möglich war Zugang zu den größeren  $\beta$ -barrels als synthetische Ionenkanäle zu bekommen. Ein Rückgrat aus starren Oligo-(*para*-Phenylene) bildet hierbei die Grundlage für 3D-*turns* für den Ionenkanal. An diese Oligophenyle angebrachte, kleine Peptidketten interkalieren mit den Peptiden von benachbarten 3D-*turns* und bilden dadurch antiparallele  $\beta$ -Faltblätter.<sup>[63]</sup> Die Größe des  $\beta$ -barrels wird durch die Länge der Peptidketten bestimmt. Ein asymmetrischer Einbau wurde im Gegensatz zu den Ansätzen von Fyles und Kobuke durch einen Push-Pull-Effekt entlang des Rückgrats erreicht, wodurch die Verbindungen neutral sind.<sup>[64]</sup> In Schema 6 ist Verbindung **13** gezeigt, welche ein  $\beta$ -barrel bestehend aus sechs Monomeren bildet. Dieser Ionenkanal **14** ist durch angelegte Spannung schaltbar und es konnte eine Blockade durch DNA nachgewiesen werden.



**Schema 6:** Beispiel für ein Rigid-Rod Push-Pull Oligo-(*para*-Phenylene). Die Peptidkette besteht aus Leucin, Lysin und Leucin.

*Woolley et al.* brachten im Jahr 2000 eine Neuerung auf dem Gebiet der Gramicidin A-Ionenkanäle heraus.<sup>[65]</sup> Gramicidin A **15** ist ein Pentadecapeptid, welches vom Bakterium *Bacillus brevis* synthetisiert wird und antibiotische Eigenschaften besitzt (Schema 7). Aufgrund der alternierenden L- und D-Aminosäuren bildet Gramicidin A (gA) eine  $\beta$ -Helix aus. In Membranen dimerisieren zwei gA-Helices und bilden so den aktiven Kanal. Die Gruppe von *G. A. Woolley* substituierte am N-Terminus das Valin von gA gegen eine Aminosäure mit einer photoaktiven Azobenzol-Gruppe.<sup>[65]</sup> Mit Verbindung **16** wurde eine

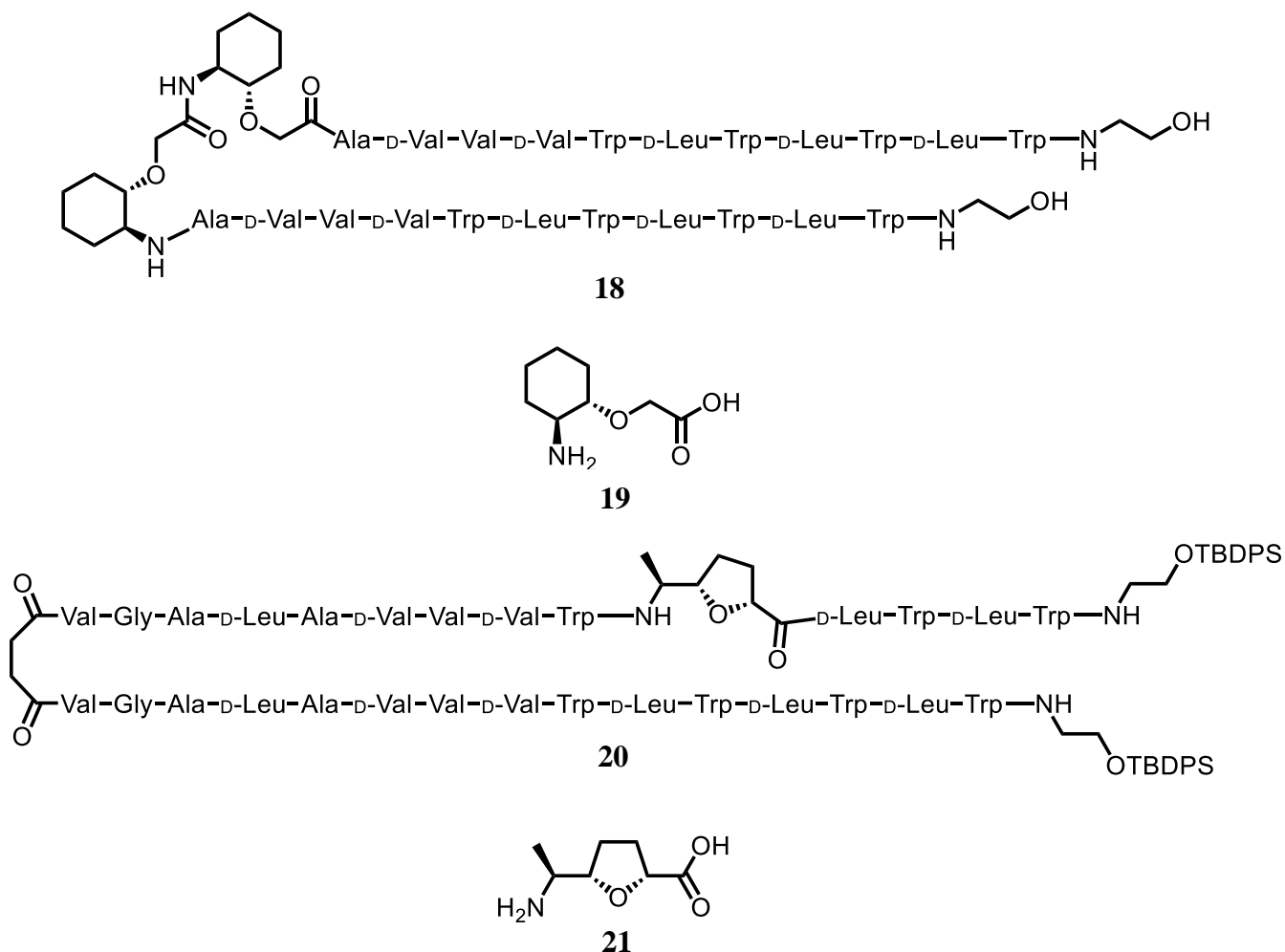
Photoschaltbarkeit erreicht, die auf eine konformationelle Änderung der Azobenzol-Gruppe und damit auf eine Änderung des Dipolmoments der Pore (**16**  $\rightarrow$  **17**) zurückgeführt wird (Schema 7). Es wurde eine um 20-30% niedrigere Leitfähigkeit durch die Photoisomerisierung erhalten.



**Schema 7:** Gramicidin A **15** und die von Woolley *et al.* hergestellten Derivate **16** bzw. **17**.

Ein Jahr später publizierte Koert *et al.* ein kovalent fixiertes Dimer eines Elf-mer-Gramicidin-Segments **18**.<sup>[66]</sup> Die beiden Segmente wurden über ein Dimer der  $\delta$ -Aminosäure **19** verknüpft (Schema 8). Der Kanal zeigte eine bemerkenswerte Selektivität gegenüber einwertigen Kationen. Cäsium und Ammonium wurden gut geleitet, bei Natrium und Lithium hingegen konnten keine Einzel-Kanal-Events festgestellt werden. Insgesamt war die Ionenselektivität 3- bis 4-mal größer als bei nativem Gramicidin A. Kurz darauf wurde mit Verbindung **20** ein unsymmetrisches gA-Derivat erzeugt bei dem ein asymmetrischer Einbau in Membranen beobachtet werden konnte.<sup>[67]</sup> Die Aminosäuren D-Leu<sup>10</sup>-L-Trp<sup>11</sup> wurden durch die THF-Aminosäure **21** ersetzt und ein nativer Gramicidin A-Strang mit dem modifizierten Teil einer Succinat-Brücke verbunden (Schema 8). Es konnte gezeigt werden, dass diese

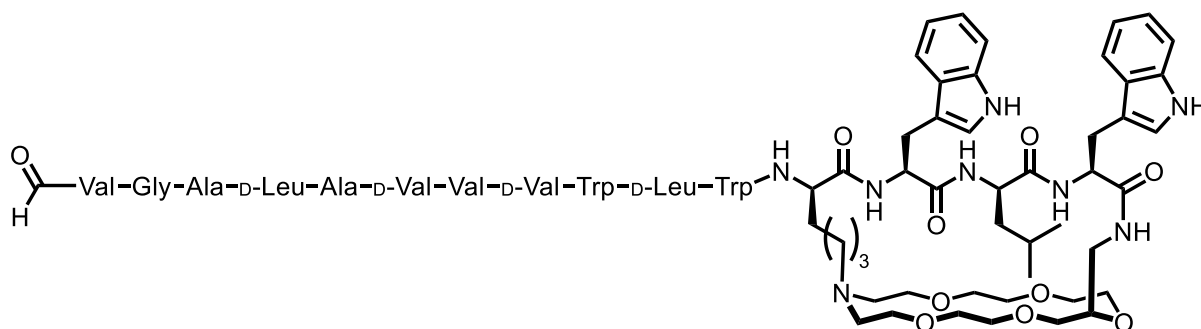
unsymmetrische Verbindung sich selektiv zuerst mit der THF-Seite in eine Membran einbaut, was bis dato noch bei keinem anderen gA-Hybrid gelungen war.



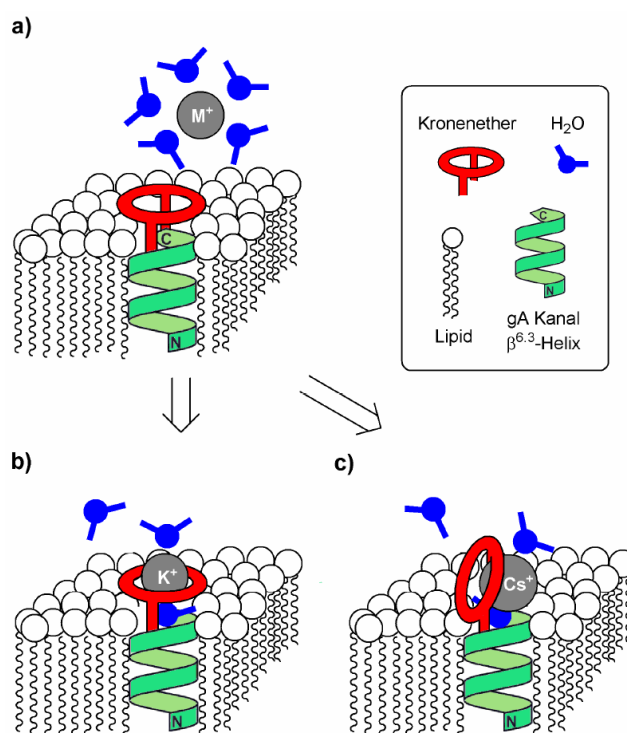
**Schema 8:** Derivatisierungen von Gramicidin A von der Arbeitsgruppe Koert.<sup>[66, 67]</sup>

*J. Pfeifer* aus der Arbeitsgruppe Koert publizierte 2006 ein neuen, interessanten Kanal. Es gelang mit dem Gramicidin A-Derivat **23** zum ersten Mal einen aktiven Kanal herzustellen, dessen Ionenselektivität im Vergleich zum Wildtyp umgedreht war ( $K^+ > Cs^+$ ).<sup>[68]</sup> Hierzu wurde am Kanaleingang an zwei Punkten ein Aza-Kronenether kovalent gebunden (Schema 9). An Position L10 wurde das D-Leucin gegen ein D-Lysin ausgetauscht, dessen  $\epsilon$ -Stickstoff am Aufbau des Azakronenethers beteiligt war. Die Azakrone sollte als Selektivitätsfilter für Kaliumionen dienen. Leitfähigkeitsmessungen bestätigten dies und zeigten, dass die relativen Leitfähigkeiten im Vergleich zum nativen Gramicidin A für Kaliumionen stiegen und für Cäsiumionen sanken. Dies lässt darauf schließen, dass die desolvatisierten  $K^+$ -Ionen gut in die Azakrone passen und den Kanal durchdringen können.

Die  $\text{Cs}^+$ -Ionen hingegen sind zu groß für die Krone und müssen sich an der Krone vorbei durch den Kanal bewegen (Abb. 1.13).



**Schema 9:** Der von J. Pfeifer hergestellte Kronen-gA-Hybrid **23**.

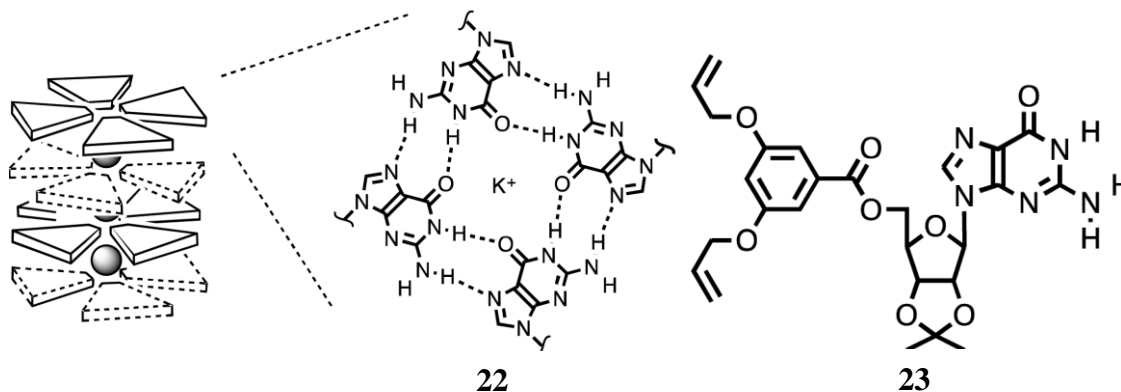


**Abb. 1.13:** Schematische Darstellung des Ionentransports von Verbindung **23**. a) Annäherung eines Metall-Kations mit Hydrathülle, b) Dehydratisierung des Kations mit Hilfe des Azakronenethers und Transport durch den Kanal, c) Dehydratisierung und Bewegung durch den Kanal an der Krone vorbei.

Im Jahre 2006 wurden  $\pi$ -stacks als neues Strukturmotiv für synthetische Ionenkanäle eingeführt. Mit verantwortlich war dabei eine Publikation von *Davis et al.* über sogenannte G-Quartett-Ionenkanäle.<sup>[69]</sup> G-Quartette sind aus Guanin-Derivaten geformte Tetramere, welche sich um Kaliumionen bilden (Schema 9). Diese Oligomere **22** ordnen sich in einer Membran dann übereinander an und bilden damit die membranaktive Struktur. Allerdings war deren schlechte Stabilität ein Problem, welches die Arbeitsgruppe von *Davis* mit Monomer **23** mit

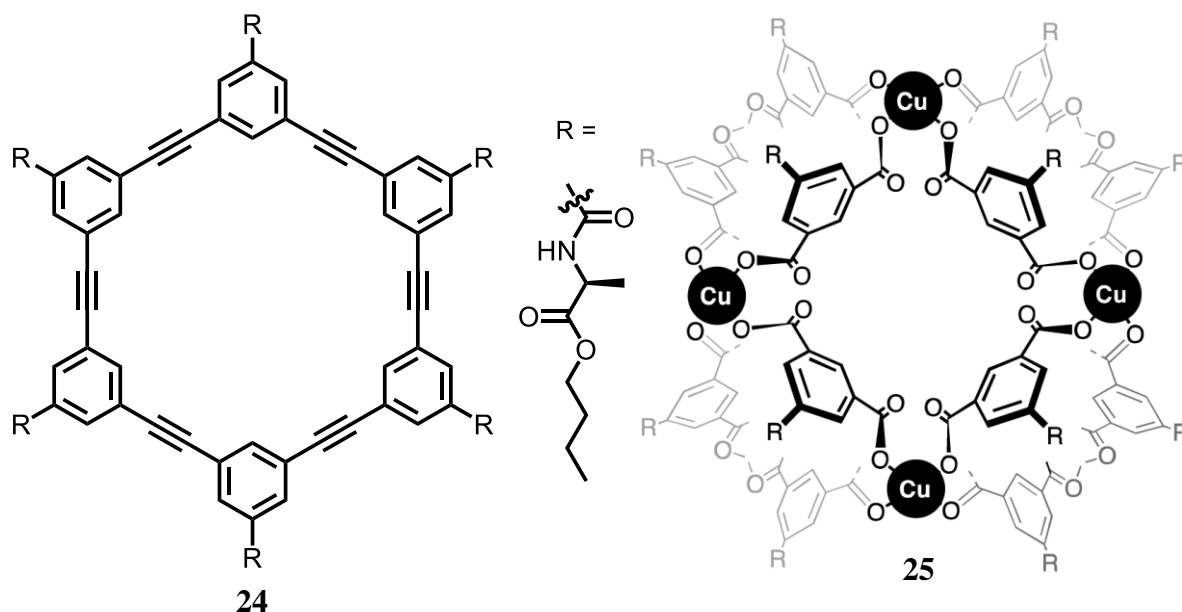


endständigen Olefinen lösen konnte. Eine Metathese mit einem Grubbs-Katalysator nach dem Einbau in die Membran gab einen unimolekularen Kanal, welcher ein Ionenkanal für Natrium war.



**Schema 9:** Allgemeine Darstellung von G-Quartetten **22** und das von Davis et al. entwickelte Monomer **23**.<sup>[68]</sup>

Eins der neusten Beispiele für  $\pi$ -stacks ist Verbindung **24** von der Arbeitsgruppe von Bing Gong.<sup>[70]</sup> Dieser Oligophenylethylen (OPE)-Makrozyklus oligomerisiert in der Membran und wird durch Wasserstoffbrückenbindungen der Seitenketten stabilisiert. Die Innenseite dieses Ionenkanals ist komplett hydrophob. Ein H/K-Permabilitätsverhältnis von ungefähr 2000 spricht stark dafür, dass sich eine über H-Brücken gebundene Kette aus Wasser innerhalb der Pore befindet und der Kanal ein synthetischer Wasserkanal ist. In 2008 wurde mit metall-organischen Frameworks (MOFs) ein weiteres Strukturmotiv für Ionenkanäle eingeführt. Ein gutes Beispiel aus dieser Zeit ist das metall-organische Polyhedron (MOP) **25**.<sup>[71]</sup> Es wird aus *meta*-Terephthalsäuren und Cu(OAc)<sub>2</sub> hergestellt. In Lipiddoppelschichten zeigt **25** langlebige, kationselektive Einzelkanalereignisse. Die erhaltene Kationenselektivität wird auf Kationen- $\pi$ -Wechselwirkungen der Aromaten zurückgeführt.



**Schema 10:** Beispiele für Ionenkanäle auf OPE- und MOP-Basis. Verbindung **24** ist ein Wasserkanal.<sup>[70]</sup>

Verbindung **25** ist ein Kationenkanal entstanden aus interdisziplinärer Innovation.<sup>[71]</sup>

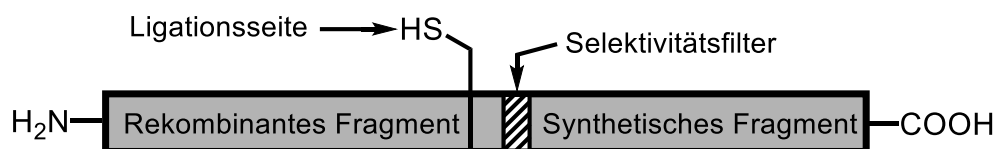
## 1.7 Chemische Modifikation von Proteinen und Ionenkanälen

Neben dem Arbeiten auf synthetischen Ionenkanälen wurde in den letzten Jahren ein großes Augenmerk auf die chemische Modifikation von Proteinen gelegt. Es wurden Methoden entwickelt, um Proteine allgemein zu funktionalisieren<sup>[72 - 75]</sup>, um das Schaltverhalten von Ionenkanälen allgemein zu beeinflussen<sup>[76 - 78]</sup> oder um vor allem Porenproteine als Detektoren für diverse Analyten zu verwenden.<sup>[79, 80]</sup>

Das große Problem bei der Modifikation von Proteinen ist die beträchtliche Anzahl an unterschiedlichen Funktionalitäten innerhalb des Makromoleküls. Es soll meistens nur eine Funktionalität auf einmal variiert werden und bei gängigen Peptidfunktionalitäten wie Alkoholen oder Aminen stößt man schnell an die Grenzen. Ein Weg dies zu umgehen ist die Synthese entsprechender Peptidfragmente, um diese dann später in das Protein einzubringen. Die bekannteste Methode hierzu ist die *native chemical ligation* (NCL). Der Vorteil dieser Methode ist, dass jede beliebige Aminosäure in der Sequenz des künstlichen Peptids modifiziert werden kann. Weiter Methoden beruhen darauf besondere, einzigartige Funktionalitäten in einem Protein anzusteuern. Als besonders geeignet hat sich hierbei Cystein mit seiner Thiol-Funktion erwiesen, welche besonders nukleophil ist. Da Cystein allerdings zu den am seltensten vorkommenden Aminosäuren gehört, wird dies häufig durch gerichtete Mutation in das gewünschte Protein eingeführt.

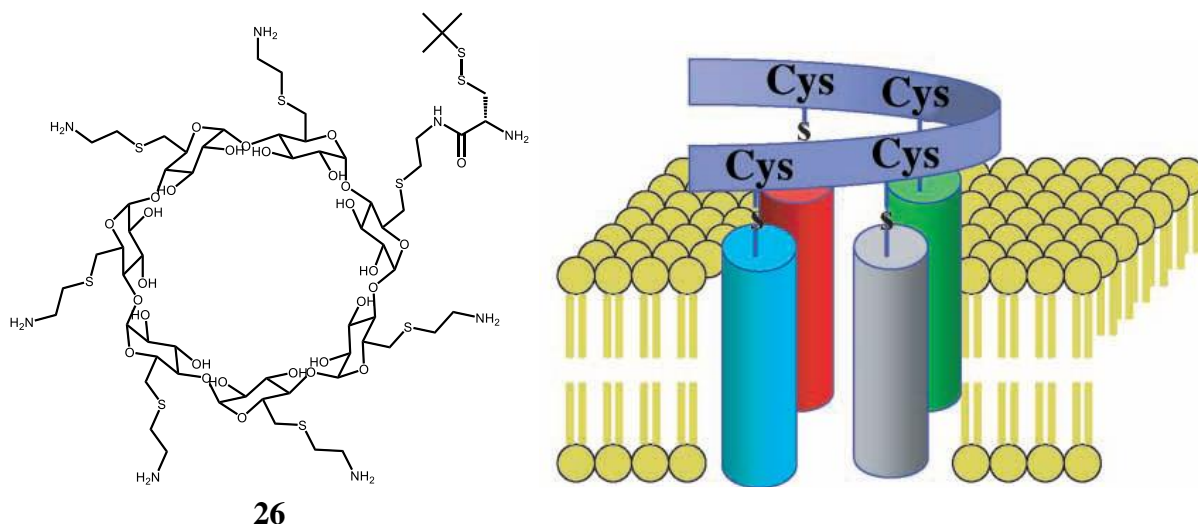
Im Nachfolgenden sollen Beispiele gezeigt werden wie diverse Techniken angewendet werden um Selektivitätsprobleme bei Proteinen zu umgehen und somit Biohybride mit neuen Funktionalitäten und Eigenschaften erhalten werden.

*Valiyaveetil et al.* zeigten, wie man mit Hilfe eines durch NCL hergestellten Peptids die Öffnungszeiten eines Kanals beeinflussen kann.<sup>[67]</sup> Sie postulierten, dass der KscA-Wildtyp 1-125 zwar aktiv ist, aber die Öffnungszeiten in BLM-Messungen zu gering wären um aufgelöst werden zu können. Es wurde somit ein Peptidfragment für die NCL hergestellt, in dem eine Aminosäure gegen ein Helix-brechendes Glycin ausgetauscht wurde. Nach Verknüpfung mit dem exprimierten Restpeptid wurde ein Kanal mit messbaren Öffnungszeiten erhalten. Weiterhin hatten sie dadurch Zugang den Selektivitätsfilter zu untersuchen, welcher sich in dem chemisch synthetisierten Fragment befindet und über andere, gängige biochemische Verfahren nicht zugänglich ist (Abb.1.14).



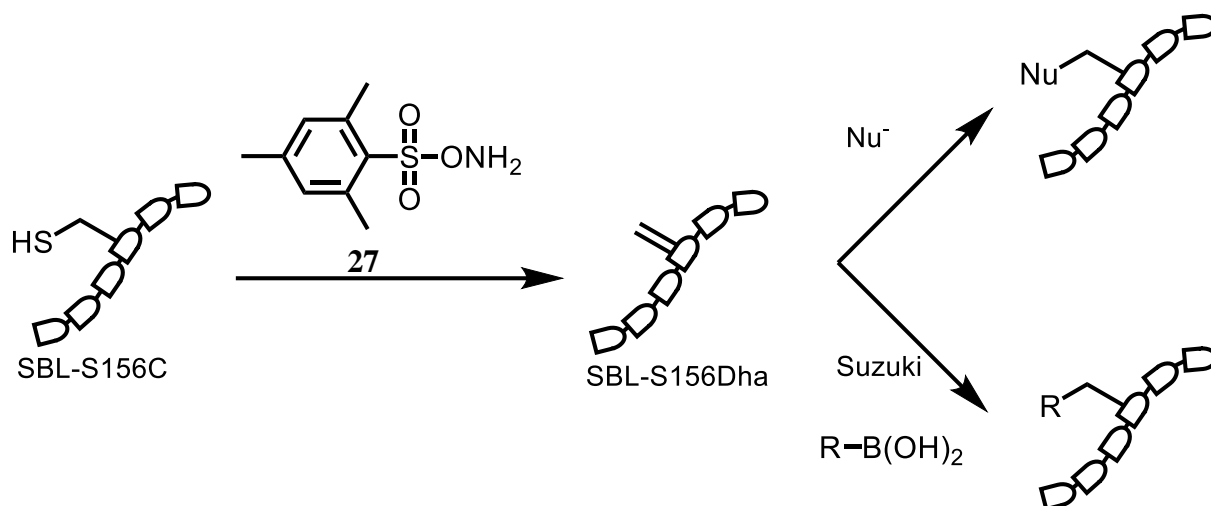
**Abb. 1.14:** Schematische Darstellung des durch NCL hergestellten KscA-Kanals.<sup>[67]</sup>

Die Arbeitsgruppe von *L. Brunsveld* konnte zeigen, dass es mit Hilfe von  $\beta$ -Cyclodextrin **26** (Abb. 1.15) möglich ist Proteindimer aus ansonsten nicht aggregierenden Proteinen zu erhalten.<sup>[68]</sup> Hierzu setzten sie **26** unter reduktiven Bedingungen mit einem monomeren gelben Fluoreszenzprotein (mYFP) um, welches durch einen Thioester aktiviert war. Das erhaltene modifizierte Protein zeigte nun mit einem mit Lithocholsäure modifizierten Protein starke Wechselwirkung. Dies ist ein Beispiel, wie man Proteine auf Oberflächen immobilisieren könnte und wie die selektive Modifikation der äußeren Proteinoberfläche dazu verwendet werden könnte Detektorsysteme zu bauen. *Futaki et al.* hingegen verknüpften vier verschiedene Na-Ionenkanäle an ihrer transmembran Seite durch eine Peptidkette mit Cysteinresten (Abb. 1.15). Hierdurch konnte ein Tetramer erhalten werden, welches allerdings nicht weiter untersucht wurde.<sup>[69]</sup> Der Grund hierfür war, dass Kristallstrukturen zeigten, dass Ionenleiterbahnen von Membrankanälen komplexer sein können als einfache Helix-Pakete.



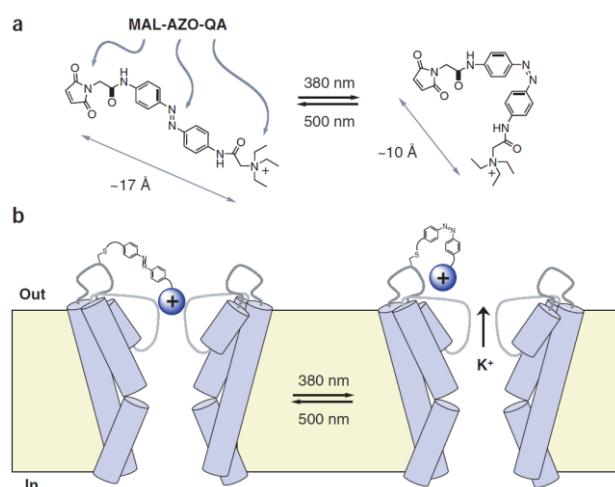
**Abb. 1.15:**  $\beta$ -Cyclodextrin-Derivat **26**, welches von *Brunsveld et al.* zur selektiven Dimerisierung von Proteinen benutzt wurde<sup>[68]</sup> und schematische Darstellung der Verknüpfung von vier unterschiedlichen Na-Kanälen mittels Peptid-Backbone von *Futaki et al.*<sup>[69]</sup>

Ein neuer Weg um Proteine zu derivatisieren wurde von der Arbeitsgruppe von *B. G. Davis* 2008 entwickelte. Sie setzten cysteinhaltige Proteine mit dem Reagenz *O*-Methylsulfonylhydroxylamin (MSH) **27** um, wodurch das Thiol eliminiert werden konnte und ein Dehydroalanin (Dha) erhalten wurde. An die entstandene Doppelbindung konnten Thiole, Kohlenstoffnukleophile oder Amine addiert werden. Weiterhin zeigten sie, dass die Doppelbindung unter SUZUKI-Bedingungen reagierte und damit ein weiter Zugang zu natürlichen und unnatürlichen Aminosäuren möglich ist (Schema 11).<sup>[70]</sup> Der Vorteil dieser Methode ist es schnell Proteine an der Oberfläche zu modifizieren ohne weitere Änderungen im Molekül vornehmen zu müssen, wie zum Beispiel bei einer NCL (eventuelle Einführung eines weiteren Cysteins). Der Nachteil ist allerdings, dass es zu einer Racemisierung des Stereozentrums kommt und dass nur sterisch einfach zugängliche Cysteine verlässlich derivatisiert werden



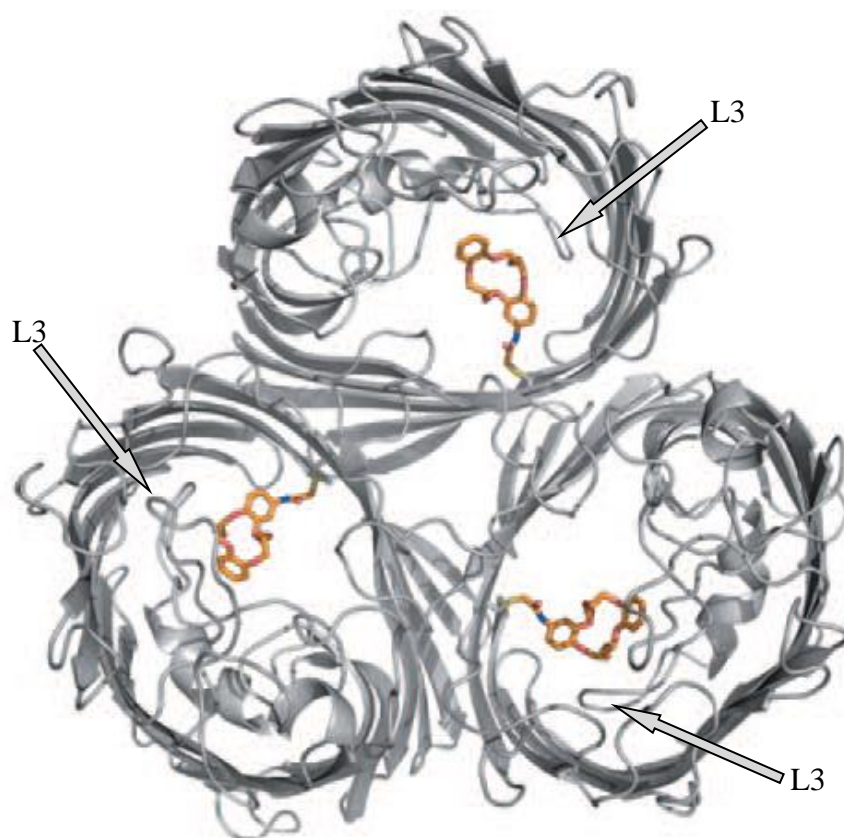
**Schema 11:** Modifikation eines Cystein-Rests mittels *O*-Mesitylenesulfonylhydroxylamin (MSH) **27** am Beispiel der Mutante Subtilisin *Bacillus lentus* (SBL) S156C.<sup>[70]</sup> Die entstandene Doppelbindung kann mit diversen Nukleophilen über eine 1,4-Addition umgesetzt werden oder durch eine SUZUKI-Kupplung derivatisiert werden.

Ein gutes Beispiel, wie Schaltverhalten von Porenproteinen beeinflusst werden können, wurde von *D. Trauner* und *R. H. Kramer* gefunden.<sup>[71]</sup> Sie mutierten den *Shaker*-Kanal H4 an der Stelle Glu422 zu einem Cystein und setzten dann die Verbindung Mal-AZO-QA über eine 1,4-Addition mit dem Protein um. MAL-AZO-QA ist eine lichtaktive Verbindung, die bei Lichteinwirkung eine *E/Z*-Isomerisierung zeigt. Das kovalent gebundene *E*-Isomer ist lang genug um den Selektivitätsfilter von H4 zu blockieren. Wird diese Mutante mit violetterm Licht bestrahlt kommt es zu einer Konformationsänderung und die Pore wird entblockt. Dieser Prozess ist durch grünes Licht umkehrbar und somit wurde ein mit Licht schaltbarer Ionenkanal synthetisiert (Abb. 1.16).



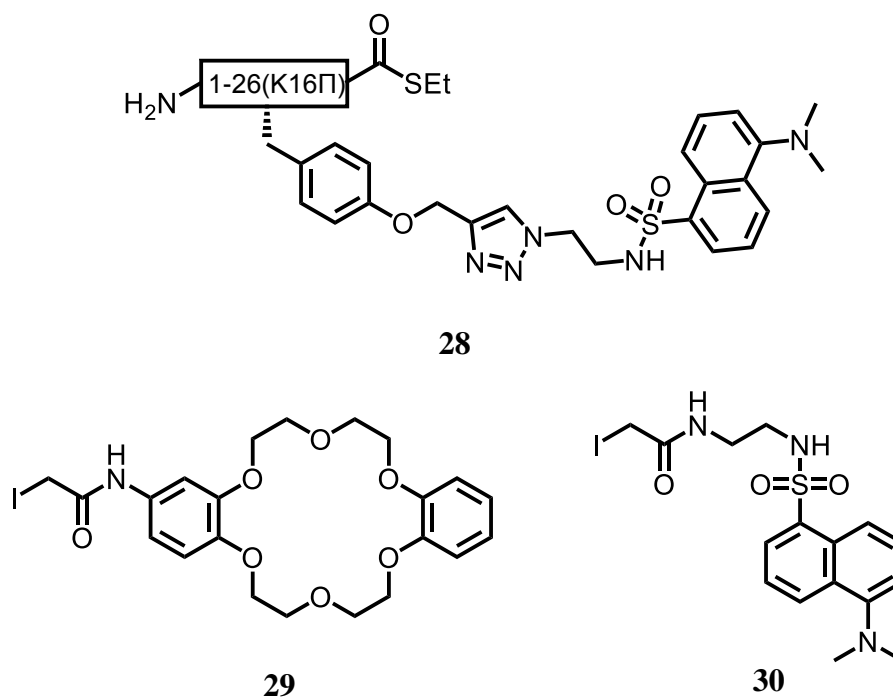
**Abb. 1.16:** Schematische Darstellung der Photoschaltbarkeit des *Shaker*-Kanals von *D. Trauner* und *R. H. Kramer*.<sup>[71]</sup>

Porine sind mit ihrer robusten  $\beta$ -barrel-Struktur gute Kandidaten für synthetische Modifikationen. OmpF war eines der ersten Porine in welches nicht natürlich vorkommende Bausteine eingebracht wurden. In unserem Arbeitskreis wurden aus diesem Grund drei verschiedene Modulatoren für OmpF hergestellt: das Peptid **28** für eine Protein-Semisynthese mittels NCL, die Dibenzokrone **29** und das Dansyliodacetamid **30** (Schema 12). Diese Verbindungen wurden von *S. Reitz* aus der Arbeitsgruppe Essen mit den entsprechenden OmpF-Mutanten umgesetzt. Für die Iodacetamide **29** und **30** wurde die Mutante OmpF\_K16C gewählt, bei der Lys16 gegen ein Cystein für eine selektive, nukleophile Substitution der Iodide ausgetauscht wurde und für das Peptid-Fragment wurde die entsprechende Deletionsmutante mit einem endständigen Cystein verwendet. Nach Umsatz und Rückfaltung der Proteine wurde festgestellt, dass das über NCL erhaltene Protein keine signifikante Leitfähigkeitsänderung in BLM-Messungen im Vergleich zum Wildtyp zeigte. Die über nukleophile Substitution erhaltenen Biohybride hingegen zeigten beide eine Reduktion der Leitfähigkeit um 45%.<sup>[72]</sup> Weiterhin konnte eine Kristallstruktur des partiell geblockten Kanals erhalten werden, die bis dahin einzigartig war (Abb. 1.1X).



**Abb. 1.1X:** Darstellung der von *S. Reitz* erhaltenen Kristallstruktur der Mutante OmpF-K16C mit der Dibenzokrone **18**. Die Dibenzokrone **18** blockiert zusammen mit L3 die Konstriktionszone und führt zur Erniedrigung der Leitfähigkeit.

Eine ähnliche Methode wurde bei der Modifizierung des monomeren Porins OmpG gewählt. Eine OmpG-Mutante mit einem Cystein an Position 209 wurde mit dem UV-Marker **30** umgesetzt. Es konnte festgestellt werden, dass dieser Modulator zwar die Leitfähigkeit senkt, aber die fast keinen Einfluss auf das Schaltverhalten hatte.<sup>[73]</sup>

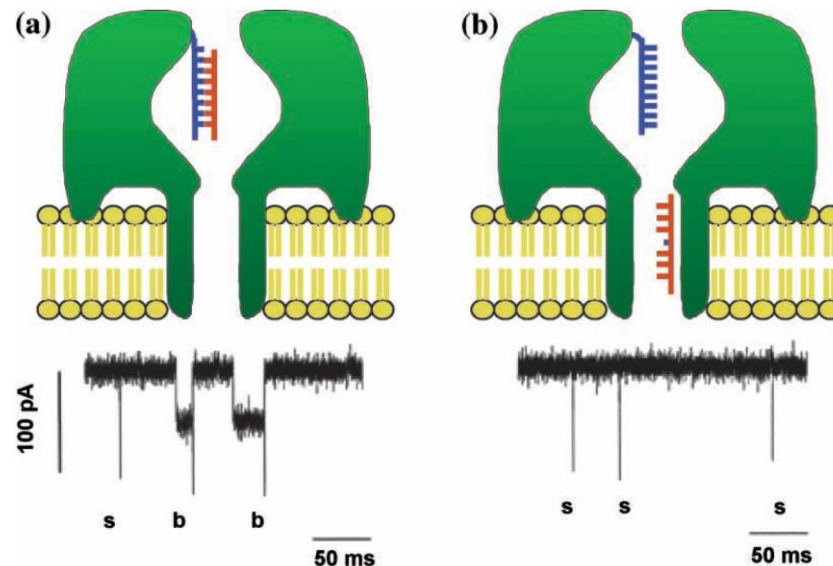


**Schema 12:** Verbindungen für die Modulation von OmpF und OmpG.

$\alpha$ -Hämolysin ( $\alpha$ HL) ist eine der am besten untersuchten Poren für Biosensorik und *stochastic sensing*. Dies ist auf die Tatsache zurück zu führen, dass  $\alpha$ HL nicht viel mehr macht als große, einheitliche Löcher in Membranen zu bilden, die unselektiv Ionen leiten.<sup>[74]</sup>  $\alpha$ HL ist eine heptamere Pore, die, ähnlich zu OmpG und VDAC, ein  $\beta$ -barrel bildet. Durch chemische Modifikation gelang mit dieser Pore die Detektion von DNA-Strängen.<sup>[75]</sup> Hierzu wurde über Mutagenese eine monomere Untereinheit von  $\alpha$ HL mutiert. Die erhaltene Mutante  $\alpha$ HL-17C-D4, welche ein Cystein an Position 17 enthält und vier Aspartate am C-Terminus, wurde zusammen mit Wildtyp-Monomeren mit 5'-S-Thiopyridiyl-Oligonucleotiden umgesetzt. Die Wildtyp-Monomere (H) und die Mutante (17C-oligo) wurden dann in Membranen zusammengesetzt. Die unterschiedlichen Heteroheptamere (H7, H6(17C-Oligo) und H5(17C-oligo)<sub>2</sub>) konnten auf Grund der Aspartat-Kette an dem mutiertem Monomer in einer SDS-PAGE aufgetrennt und aufgereinigt werden.

Wurde ein komplementärer Basenstrang nun hinzugegeben konnte sich eine Doppelhelix bilden, welche den Kanal blockierte. Nicht komplementäre DNA-Stränge, selbst wenn nur

eine Base nicht passte, zeigten keine Reduktion der Leitfähigkeit. Mit dieser Modifikation wurde ein hoch selektives System zur Detektion von DNA-Sequenzen entwickelt, welches Anwendung zum Beispiel bei der Identifizierung von bekannten Wirkstoffresistenten bei Krankheitserregern finden könnte.



**Abb. 1.17:** Detektion von komplementären DNA-Strängen.<sup>[75]</sup> (a): Ausbilden einer DNA-Doppelhelix in der Pore mit einem komplementären DNA-Strang führt zu einer Blockade des Kanals. Es sind zwei Ereignisse zu erkennen. (b): Ist ein Strang nicht komplementär kann keine Doppelhelix gebildet werden und der Strang wird durch die Pore gespült. Es kommt zu keiner Erniedrigung der Leitfähigkeit.

Weitere Beispiele wie  $\alpha$ HL oder OmpG für Biosensorik verwendet werden können werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

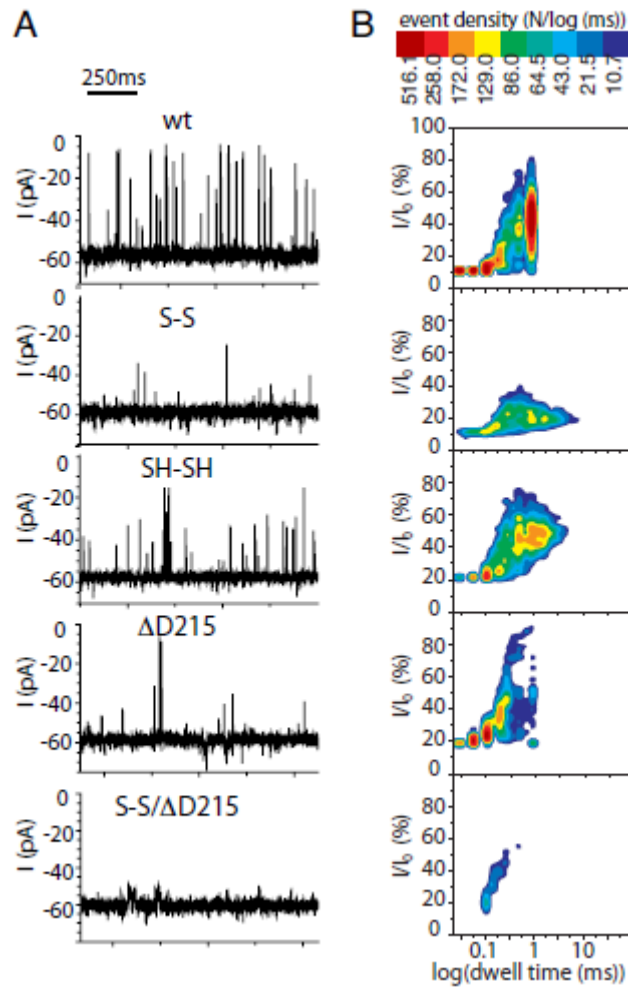


## **1.8 OmpG und VDAC-Biohybride**

Erste Ergebnisse auf dem Gebiet der Biosensorik und Herstellung von Biohybriden ist *Bayley et al.* mit  $\alpha$ -Hämolysin gelungen.  $\alpha$ HL ist ein heptamer Porenprotein, welches, ähnlich wie OmpG, ein 14-strängiges  $\beta$ -barrel bildet, wobei jeweils ein Monomer zwei  $\beta$ -Faltblätter des barrels stellt. Durch das Hineinmutieren von Asparaginsäure und Zugabe von  $\beta$ -Cyclodextrin wurde ein partielles Schließen der Pore in BLM-Messungen erkannt. Wird anschließend eine Adamantylderivat hinzugegeben kommt es zu neuen Schließvorgängen, die ohne  $\beta$ -Cyclodextrin nicht auftreten. Auch andere organische Moleküle ergeben solche Schließvorgänge, alle jeweils mit charakteristischen Spuren in der BLM-Messung.<sup>[81]</sup>

Das Problem mit dem  $\alpha$ HL-System ist die oligomere Struktur, da sichergestellt werden muss, dass keine Gemische aus modifiziertem und unmodifiziertem Protein erhalten wurden. Dieses Problem stellt sich bei den monomeren Porinen wie OmpG nicht.<sup>[3, 9, 19-21]</sup> *Bayley et al.* haben 2008 erste Ergebnisse bei der Modifikation von OmpG veröffentlicht. Sie zeigten wie das Porin zur ADP Detektion modifiziert werden kann.<sup>[82]</sup>

OmpG ist, wie schon in Kapitel 1.3 erwähnt, bei hohen pH-Werten geöffnet und bei niedrigen pH-Werten faltet sich L6 über die Pore und blockiert damit den Durchfluss. Bei Spannungen von mehr bzw. weniger als  $\pm 100$  mV geht OmpG auch in den geschlossenen Zustand über. Bei Spannungen jedoch zwischen +100 mV und -100 mV öffnet und schließt die Pore spontan. Es kommt zum sogenannten *flickering*. Die Gruppe entwickelte zwei Mutanten, um das *flickering* zu unterdrücken. Einmal wurden G231 in  $\beta$ 12 und D262 in  $\beta$ 13 zu Cysteinen mutiert um den L6 über eine Disulfidbrücke im offenen Zustand zu fixieren und einmal wurde D215 entfernt, da es dadurch in  $\beta$ 11 zu einer Unregelmäßigkeit im  $\beta$ -Faltblatt kommt, was die Wasserstoffbrückenbindungen stört.



**Abb. 1.18:** **A:** Einzelkanalmessungen der OmpG-Mutanten, **B:** Zugehörige 2D-Zustandsverteilung, die Amplitude ( $I$ ) ist die Spannungsänderung relativ zu der Spannung im voll geöffnetem Zustand.<sup>[81]</sup>

Beide Varianten (OmpG/S-S und OmpG/ΔD215) zeigen eine deutlich ruhigere Pore. OmpG/S-S reduziert die Anzahl der geschlossenen Zustände, lässt aber die Dauer fast unverändert. OmpG/ΔD215 hingegen reduziert die Dauer, aber die Anzahl der geschlossenen Zustände ändert sich nicht. Eine Kombination beider Mutationen führt zu einem fast vollständig ruhigen Kanal (Abb. 1.17). Wird Heptakis-(6-deoxy-6-amino)-  $\beta$ -cyclodextrin ( $\text{am}_7\beta\text{CD}$ ) hinzugegeben kommt es zu einer reduzierten Leitfähigkeit, was auf den Einbau des  $\text{am}_7\beta\text{CD}$  zurückzuführen ist. Wird  $\text{am}_7\beta\text{CD}$  und ADP gleichzeitig zu der Pore gegeben, wird neben dem normalen Schließverhalten von  $\text{am}_7\beta\text{CD}$  noch einen Zustand niedrigerer Leitfähigkeit beobachtet. Dies kann zur Detektion von ADP verwendet werden.<sup>[82]</sup>

Grosse *et al.* haben 2010 eine weitere, kovalente Modifikation von OmpG veröffentlicht. Es wurden zwei Mutanten von OmpG hergestellt. Die Aminosäuren M13 und Y209 wurden jeweils durch Cystein ersetzt. Die Mutanten OmpG/C13 und OmpG/C209 wurden im denaturierten Zustand mit einem Dansylodacetamid umgesetzt, welches kovalent an die

Cysteine bindet. UV-Vis-Spektren bestätigten, dass der Umsatz komplett war und über Kristallstrukturen und BLM-Messungen wurde die Struktur bestätigt.

Die Forschung bei VDAC ist sehr vielseitig. VDAC gilt als mögliches Ziel für die Bekämpfung von Krebs, da gezeigt werden konnte, dass zwar VDAC für die Zellapoptose maßgeblich verantwortlich ist, allerdings diese durch das Binden von Hexokinase II an VDAC den Zelltod aufhalten kann.<sup>[83]</sup> Dadurch könnte der Hexokinas II/VDAC-Komplex ein mögliches therapeutisches Ziel für die Krebstherapie sein.<sup>[84]</sup>

Weiterhin scheint VDAC bei der Alzheimer Krankheit, welche sich im frühen Stadium vor allem durch eine Fehlfunktion der Mitochondrien äußert, eine große Rolle zu spielen.<sup>[85]</sup> In Gewebeproben von Alzheimerpatienten wurden erhöhte Amyloid beta (A $\beta$ ) phosphoryliertem Tau (phospho Tau) Werte gefunden sowie erhöhte Anzahl an VDAC-Kanälen in Mitochondrien. Neuste Forschungen zeigen, dass A $\beta$  und phospho Tau mit VDAC interagiert und den Kanal blockiert, wodurch es zu erheblichen Störungen kommt.<sup>[86]</sup>

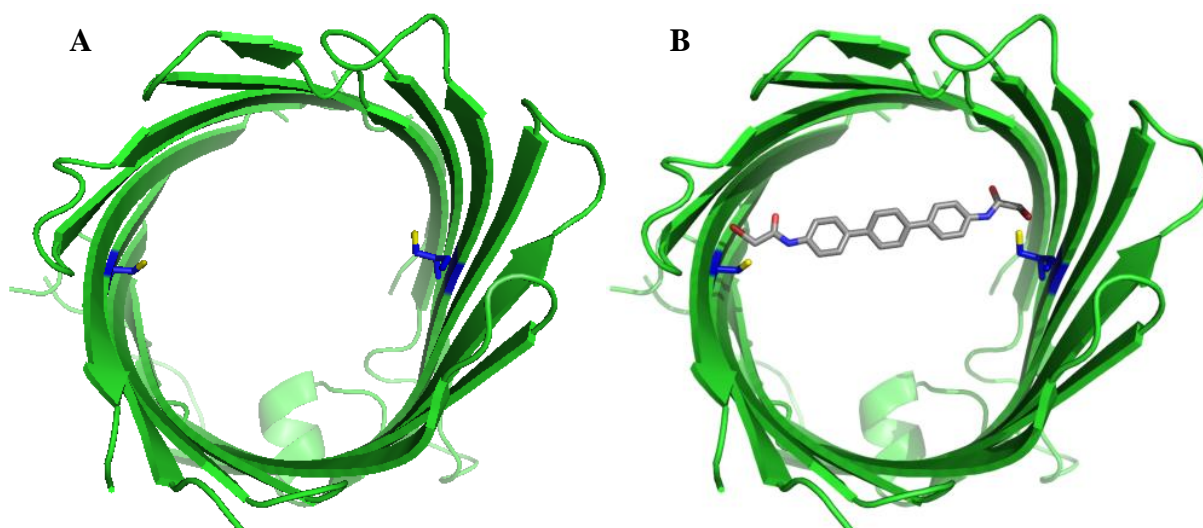
Ein anderes Augenmerk sind die zum allgemeinen Schaltverhalten. So wurde zum Beispiel mittels kovalenter Bindung der Helix an die Innenseite der Pore untersucht in wie weit die Helix für das Öffnen und Schließen des Kanals verantwortlich ist.<sup>[30]</sup> Synthetisch, chemische Modifikationen wurden bisher noch nicht an diesem Kanal vorgenommen.

---

## 2. Zielsetzung

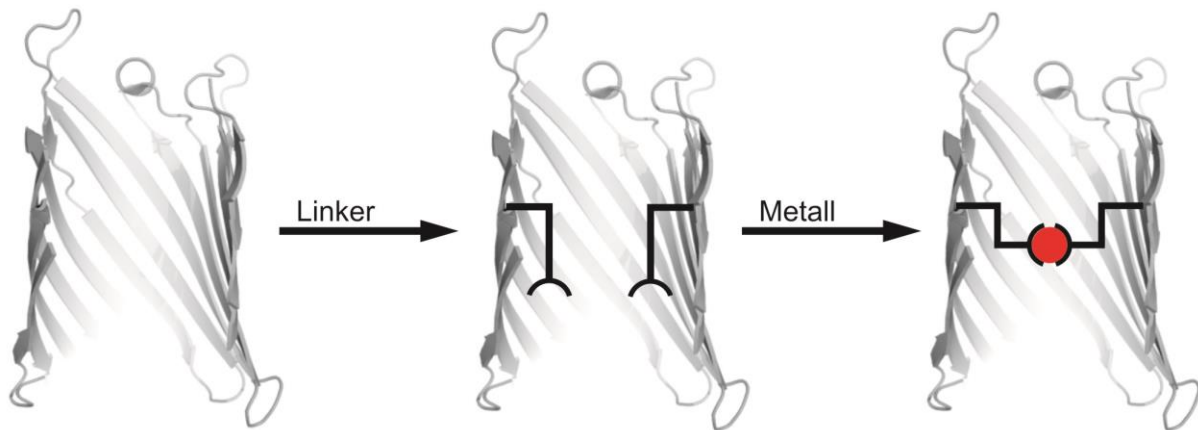
Im Rahmen dieser Promotion sollten Verbindungen zur synthetischen Modifizierung von Membranproteinen auf Basis von OmpG und VDAC hergestellt werden, wodurch Einfluss auf die Eigenschaften als Ionenkanal genommen werden soll.

Der erste Ansatz zur Modifizierung von OmpG bestand in der Synthese mehrerer Bisiod- und Bisbromacetamide. Diese sollten mit einer OmpG-Doppelmutante mit zwei Cysteinen an gegenüberliegenden Stellen der Porennenseite umgesetzt werden (Abb. 2.1). Die Haloacetamide sollten mit den Cysteinen über einen  $S_N$ -Mechanismus reagieren, wodurch eine kovalente Zwei-Punkt-Anknüpfung erreicht werden könnte. Die Pore würde dauerhaft blockiert werden, was sich in einer deutlich niedrigeren Leitfähigkeit bei BLM-Messungen äußern müsste.



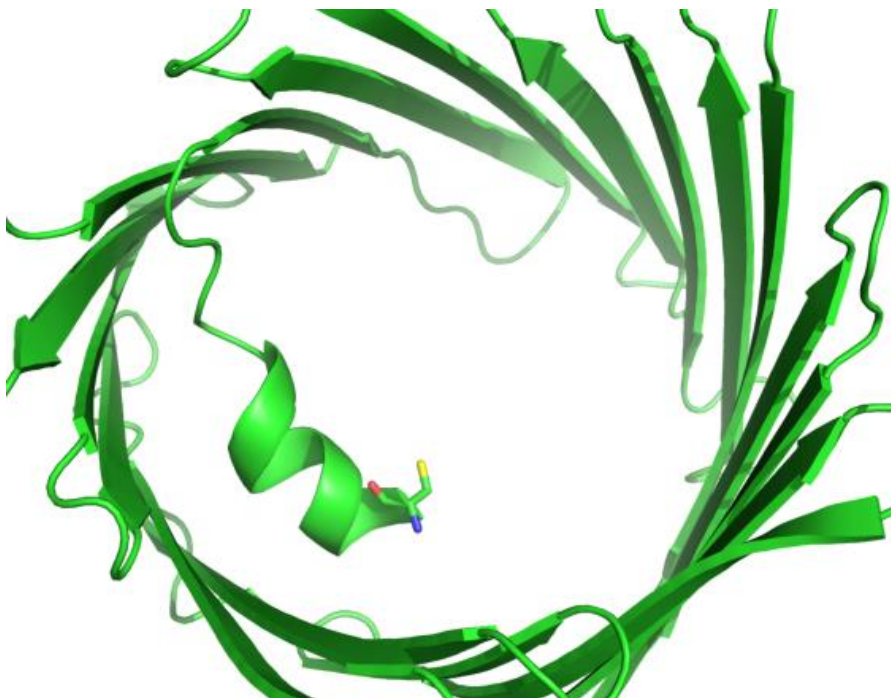
**Abb. 2.1:**      **A:** Modell der Mutante OmpG/ $\Delta$ I6/C13/C154, mutierte Cysteine wurden blau gekennzeichnet,  
                    **B:** OmpG/ $\Delta$ I6/C13/C154 mit einem Bisbromacetamid in der Pore.

Der zweite Ansatz bestand in der Synthese von Monoiodacetamiden auf der Basis von Bipyridinen. OmpG-Doppelmutanten sollten mit den Verbindungen umgesetzt werden und die doppelten Ein-Punkt-Anknüpfungen sollten in BLM-Messungen untersucht werden. Nach Zugabe eines Übergangsmetalls wie zum Beispiel Kupfer wäre zu erwarten, dass die Bipyridine das Metall komplexieren und eine *pseudo*-Zwei-Punkt-Anknüpfung erreicht werden kann.



**Abb. 2.2:** Schematische Darstellung der *pseudo*-Zwei-Punkt-Anknüpfung mit Bipyridinen bei OmpG. Die Pore wird mit Monolinkern umgesetzt und anschließend durch Zugabe eines Metalls soll es zu einer Quervernetzung kommen.

VDAC sollte mittels *native chemical ligation* modifiziert werden. Hierzu wurde die Strukturaufklärung mittels Kristallographie zugrunde gelegt und die  $\alpha$ -Helix wurde deletiert. Das entsprechende Peptid sollte mittels *Solid Phase Peptid Synthesis* (SPPS) bzw. einer Fragmentsynthese in Lösung hergestellt werden, wobei das native Peptid und diverse modifizierte Formen der Peptidkette hergestellt werden sollten. Diese Peptide sollten mit VDAC im denaturierten Zustand umgesetzt, das Protein zurückgefaltet und die Pore mit der veränderten  $\alpha$ -Helix in BLM-Messungen untersucht werden.



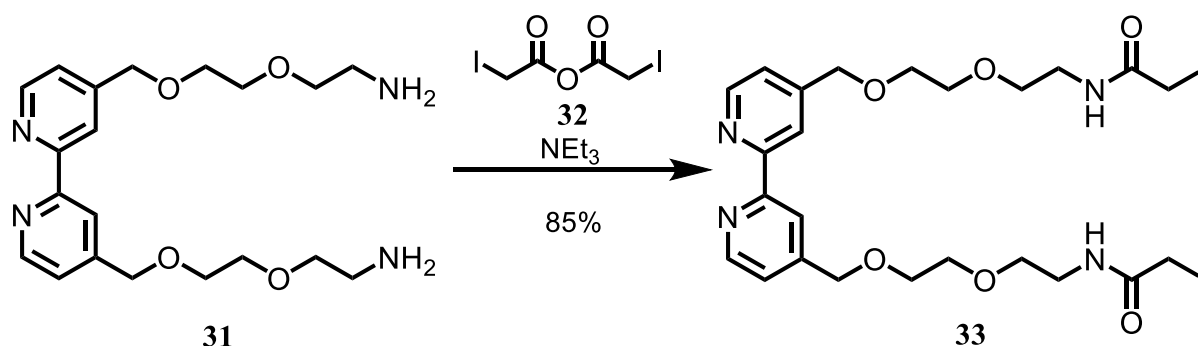
**Abb. 2.3:** Beispielhafte Darstellung einer VDAC $\Delta$ 10 Mutante mit endständigen Cystein. An dieses mutierte Cystein soll über NCS eine modifizierte Peptidkette eingefügt werden.

---

## 3. Syntheseplanung und Durchführung

### 3.1. Modulatoren für OmpG

Die ersten Grundlagen zur Modulation von OmpG wurden in der Diplomarbeit „Synthese von Bis(iodacteamiden) als Bausteine zur Porenzweipunktanknüpfung“ 2009 gelegt.<sup>[87]</sup> Es wurden verschiedene Diamine hergestellt. In dieser Arbeit wurde, wie in Schema 13 gezeigt, das Bipyridin **31** mit Iodessigsäureanhydrid (**32**) mit der Hilfsbase Triethylamin in das Bisiodid **33** mit 85% Ausbeute überführt.

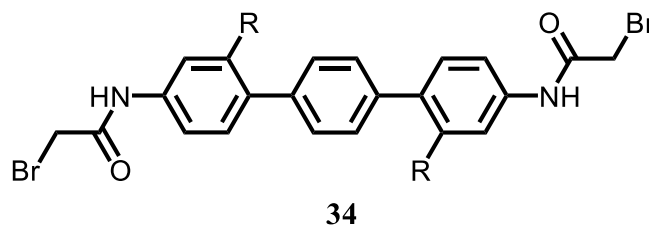


Schema 13: Synthese des ersten Modulators als Iodacetamid.

Das Bisiodid **33** wurde von Herrn Dr. Wolfgang Grosse aus der Arbeitsgruppe Essen der Universität Marburg mit der Mutante OmpG/ $\Delta$ l6/C13/C154 umgesetzt, welche zwei hineinmutierte Cysteine enthält. Laut SDS-PAGE gab es Umsatz, allerdings konnte auch nach Fingerprint Massenspektrometrie kein crossgelinktes Fragment gefunden werden. Es wurden zwar einfach angebundene Bipyridin-Linker **33** gefunden, aber der Nachweis einer verstreben Pore bleibt aus.

Um die Wahrscheinlichkeit einer kovalenten Querverknüpfung zu erhöhen sollte der Grundkörper starrer werden, damit die Beweglichkeit in Lösung geringer wird. Grundlagen dafür wurden in meiner Diplomarbeit mit der Synthese von Terphenylen gelegt.<sup>[87]</sup> Allerdings zeigte sich ein Löslichkeitsproblem der Terphenyle, da sie nahezu unlöslich in wässrigen Puffersystemen sind.

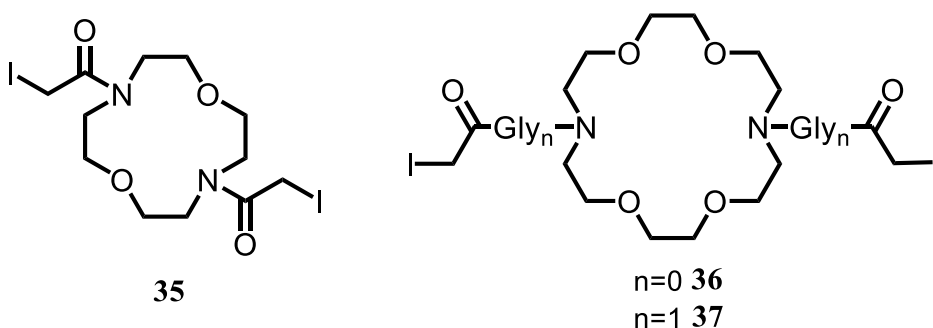
Ziel war es, Terphenyle zu synthetisieren, deren Löslichkeit in Wasser möglichst hoch ist und bei denen der Zusatz von organischen Lösungsmitteln weitgehend vermieden werden kann, damit eine Denaturierung der OmpG-Mutanten nicht stattfindet. Hierzu sollte als Leistruktur der Grundkörper **34** dienen (Schema 14).



**Schema 14:** Grundkörper der Terphenyle.

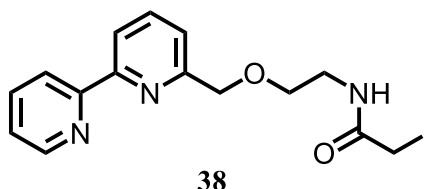
Die Terphenyle sollten über eine doppelte SUZUKI-Kupplung nach einer Vorschrift von *M. Davis*<sup>[88]</sup> aufgebaut werden, wobei die Reste in 3- und 3''-Position entweder Carbonsäuren, Ethylenglycolester oder Sulfonate sein sollten. Hierdurch könnte eine erhöhte Wasserlöslichkeit erreicht werden

Weiterhin sollte neben einer rein sterischen Blockade der Pore auch eine funktionelle Modifizierung erreicht werden. Aus der Arbeit von *M. Cebi* und *S. Reitz* zeigte sich, dass Kronenether gute Grundstrukturen für eine Funktionalisierung von Porinen darstellen.<sup>[88]</sup> Auf Basis von Lithium- und Kalium-Diazakronen sollten Bisiodacetamide verschiedener Größen hergestellt (Schema 15) und mit cysteininhaltigen OmpG-Mutanten umgesetzt werden. Eine kovalente Zwei-Punkt-Anknüpfung dieser Kronenether sollte, im Vergleich zu nativem OmpG, zu einer Ionenselektivität der erhaltenen Biohybride führen.



**Schema 15:** Struktur der geplanten Diazakronen.

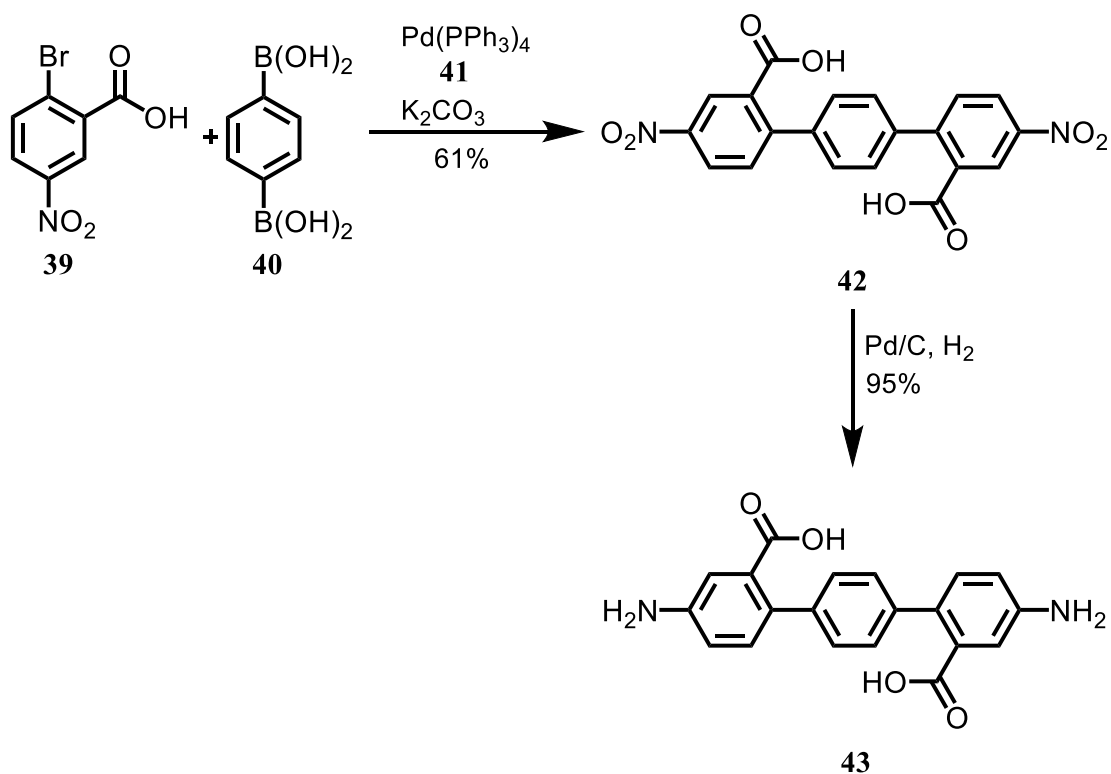
Ein weiterer Ansatz, der verfolgt wurde, war eine doppelte Ein-Punkt-Anknüpfung von Bipyridin-Derivaten (Schema 16), die mittels Übergangsmetallen *in situ* einen stabilen Komplex bilden und damit die Pore von einem teilgeöffnetem Zustand in einen geschlossenen Zustand überführen sollen.



**Schema 16:** Beispiel für ein Bipyridin-Iodacetamid für *pseudo*-Zwei-Punkt-Anknüpfung.

### 3.1.1 Synthese der Carboxyl- und Diethylenglycolesterterphenyle

Die Synthese des Aminoterphenyls **43** begann mit der SUZUKI-Kupplung von 2-Brom-5-nitrobenzoesäure (**39**) mit 1,4-Phenyldiboronsäure (**40**) mit Palladiumtetrakis(triphenylphosphin) **41** als Katalysator. Nitroterphenyl **42** wurde mit 61% Ausbeute als amorpher Feststoff erhalten. Die in Schema 17 gezeigte Verbindung **42** wurde mit Palladium auf Kohle und Wasserstoff reduziert und ergab Aminoterphenyl **43**.

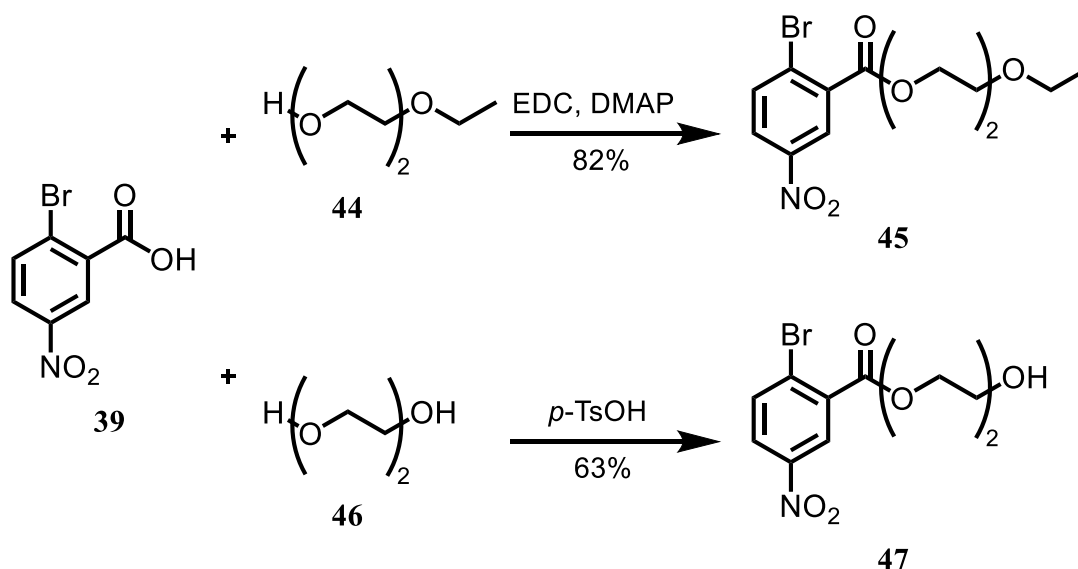


**Schema 17:** Synthese des Carboxylterphenyl **43**.



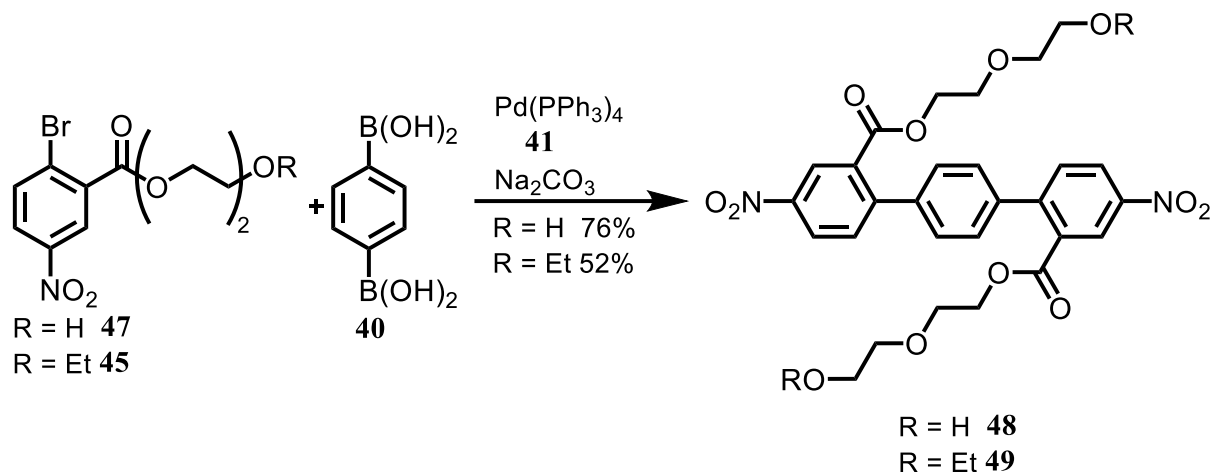
Alle Versuche **43** in das Brom- oder Iodacetamid zu überführen scheiterten und es konnte nur Zersetzung beobachtet werden. Weiterhin zeigte sich, dass **43** nur in stark polar aprotischen Lösungsmitteln löslich und nahezu unlöslich in Wasser war, was bei der zwitterionischen Struktur nicht zu erwarten gewesen wäre.

Die Synthese der Glycolester begann mit der Veresterung der Benzoesäure **9** wie in Schema 6 gezeigt. Die Veresterung mit Di(ethylenglycol)ethylether (**44**) mittels EDC und DMAP ergab nach säulenchromatographischer Reinigung Ester **45** in 82% Ausbeute. Die Veresterung mit Diethylenglycol (**46**) und der Benzoesäure **39** erfolgte nach einer modifizierten Methode von *Percec et al.*<sup>[90]</sup> mit *para*-Toluolsulfonsäure bei 120 °C und ergab den Monoalkohol **47** in 63%iger Ausbeute (Schema 18).



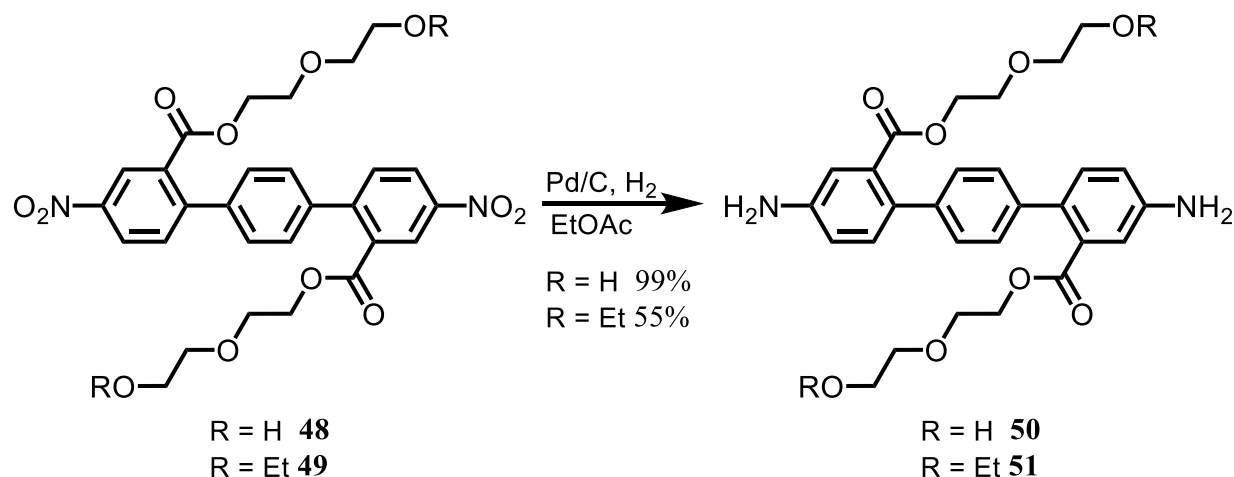
Schema 18: Synthese der Benzoesäureester **45** und **47**.

Die Suzuki-Kupplung der Diboronsäure **40** lieferte für den Ester **47** das Nitroterphenyl **48** in 76%iger Ausbeute. Die Kupplung mit dem Ester **45** lieferte in 52%iger Ausbeute das gewünschte Terphenyl **49** (Schema 19).



**Schema 19:** Kupplung der Diethylenglycolester zu Nitroterphenylen **48** und **49**.

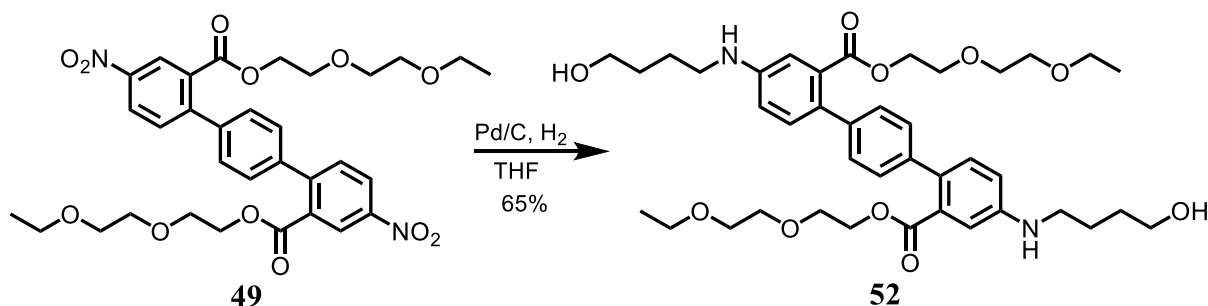
Die Reduktion der Nitrogruppen von **48** und **49**, gezeigt in Schema 20, in Ethylacetat ergab die Diamine **50** und **51** in nahezu quantitativer Ausbeute für die freien Alkohole und in 55%iger Ausbeute nach Säulenchromatographie für die Ethylether.



**Schema 20:** Reduktion der Nitrogruppen zu Aminen in EtOAc.

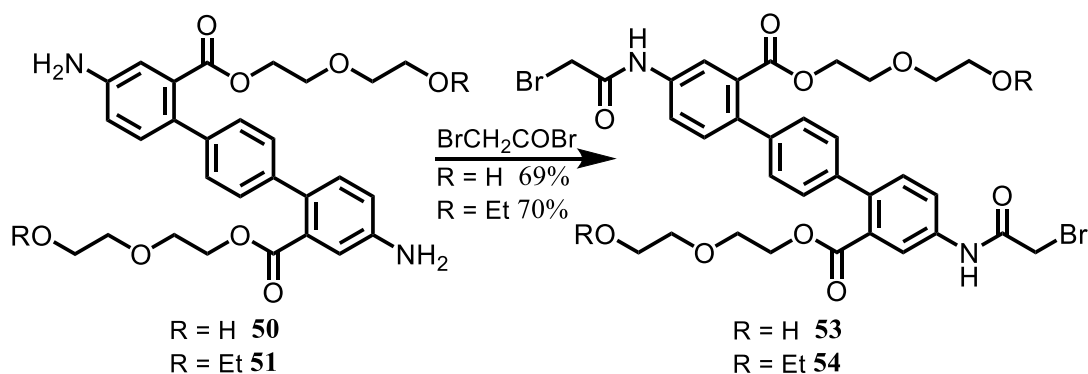
Wurde die Reduktion allerdings in THF, wie in der Vorschrift von *M. Davis*<sup>[88]</sup> vorgeschlagen, anstatt in EtOAc durchgeführt, konnte nicht das gewünschte Produkt erhalten werden. Für das Ethylderivat **49** konnte allerdings reproduzierbar ein anderes Produkt isoliert werden, dessen molare Masse 72 g/mol größer als erwartet war. Über 2D-NMR-Experimente

konnte nachgewiesen werden, dass die Nitrofunktionen reduziert wurden und anschließend von den Aminen eine nukleophile Öffnung des THFs erfolgte. Der Aminoether **52** ist in Schema 21 dargestellt.



**Schema 21:** Hauptprodukt bei der Reduktion von **49** mit THF als Lösungsmittel.

Die Umsetzung der Diamine **50** und **51** mit Bromessigsäurebromid ergab in guten Ausbeuten die Bromacetamide **53** und **54** nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Schema 22). Die Umsetzung mit Iodessigsäureanhydrid führt zu Produkten mit gleichen  $R_f$ -Werten wie die Edukte, weshalb die Aufreinigung nicht möglich war und die Route der Iodacetamide bei den Terphenylen verworfen wurde.



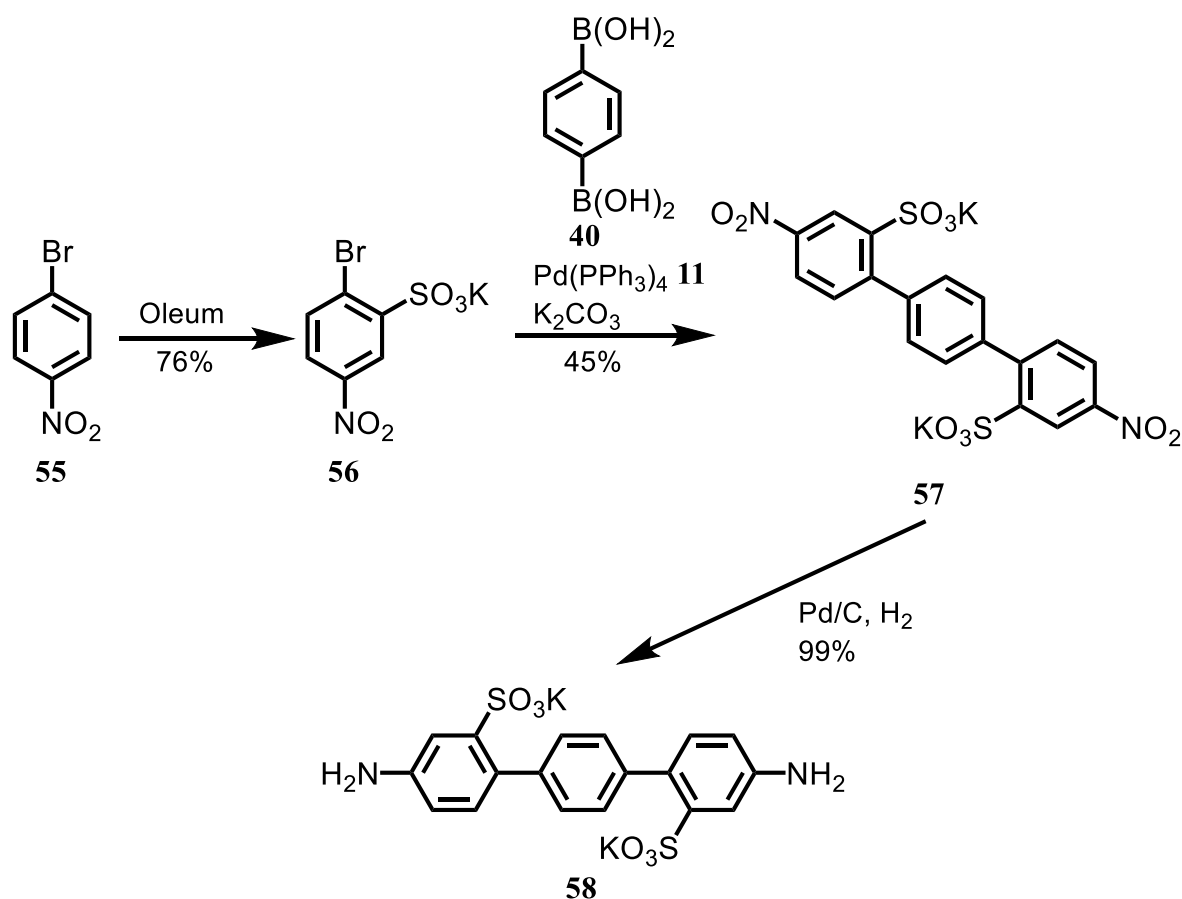
**Schema 22:** Darstellung der Bromacetamid **53** und **54**.

Die Löslichkeiten der erhaltenen Bromacetamide **53** und **54** waren relativ gut in Acetonitril (0.07 mol/L), allerdings zeigten Reaktionen mit OmpG-Mutanten, die von *G. Psakis* durchgeführt wurden, nicht den gewünschten Erfolg. Es konnte kein Umsatz beobachtet werden, sondern nur Denaturierung des Porins. Die geringe Wasserlöslichkeit der Verbindungen **53** und **54** führte zu Agglomeration der Verbindungen und die zu hohe Konzentration an Lösungsmittel führt zur Denaturierung des Proteins. Es mussten löslicher Terphenyle synthetisiert werden.

### 3.1.2 Synthese des Terphenylsulfonates **59**

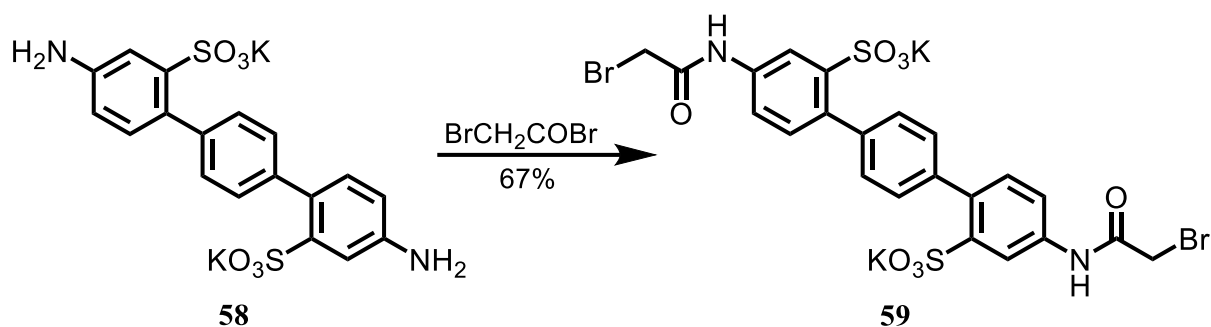
Die Synthese des Sulfonsäurederivats **59** der Terphenylreihe verlief ähnlich der Synthese der Bromacetamide **53** und **54**.

Ausgehend von 1-Brom-4-nitrobenzol (**55**), gezeigt in Schema 23, wurde nach einer modifizierten Vorschrift von A. Courtin mit Oleum bei 90 °C eine Sulfonsäure eingeführt.<sup>[91]</sup> Behandeln der Reaktionslösung mit einer wässrigen Kaliumchlorid-Lösung ergab das Kaliumsulfonat **56** in guter Ausbeute. Nach Umkristallisieren von **56** wurde mit **40** gekreuzgekuppelt, wobei das Terphenyl **57** als unlöslicher Feststoff ausfiel. Reduktion der Nitrogruppen mit Palladium auf Kohle und Wasserstoff in DMF ergab nach Entfernen des Lösungsmittels das wasserlösliche Diamin **58** in hervorragender Ausbeute.



Schema 23: Synthese des sulfonierten Diamins **58**.

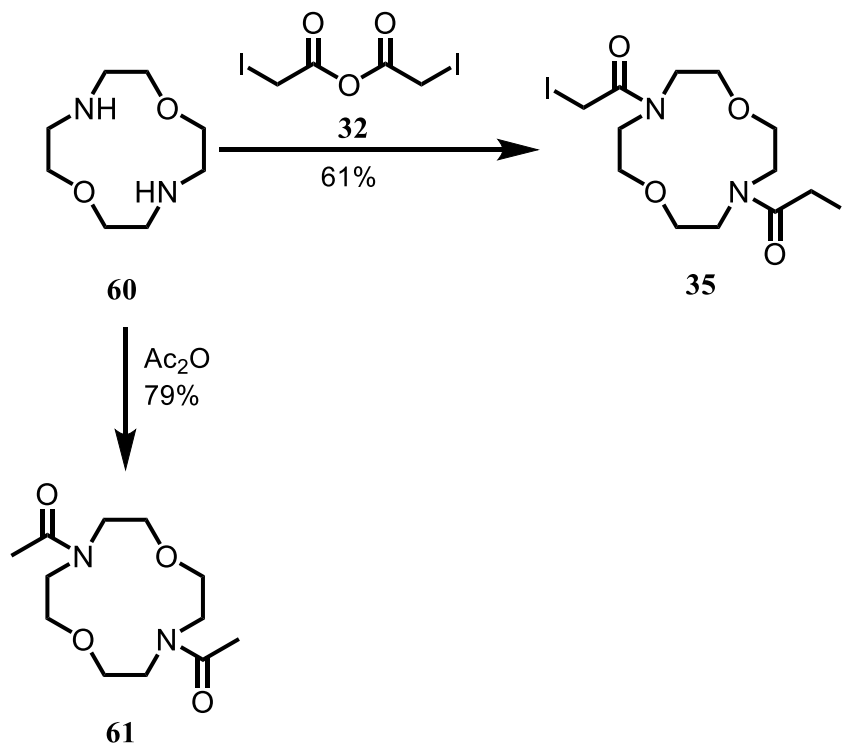
Umsetzung des Diamins **58** mit Bromessigsäurebromid in DMF bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  ergab in 67% Ausbeute das gewünschte Bisbromacetamid **59** (Schema 24).



Schema 24: Darstellung des Terphenyls **59**.

### 3.1.3 Synthese der Bisiodacetamid-Azakronen

Die Synthese des Bisiodids **35** erfolgte nach einer Vorschrift von *M. Cebi*.<sup>[89]</sup> Die Diazakrone **60** wurde mit **32** in Chloroform in 61% Ausbeute zum Bisiodid **35** umgesetzt, wie in Schema 12 gezeigt. Für temperaturabhängige NMR-Messungen wurde von **35** ein thermisch stabiles Derivat hergestellt. Hierzu wurde **60** mit  $\text{Ac}_2\text{O}$  acetyliert und es wurde Bisacetamid **61** in guten Ausbeuten erhalten (Schema 25).



Schema 25: Herstellung der 1,7-Diaza-12-Krone-4-Derivate.

Das  $^{13}\text{C}$ -NMR von Verbindung **35** und **61** zeigte entgegen aller Erwartungen 12 Kohlenstoffsignale, wobei das Massenspektrum zu der Zielverbindung passte. Das Spektrum von **61** ist in Abb. 3.1 gezeigt.

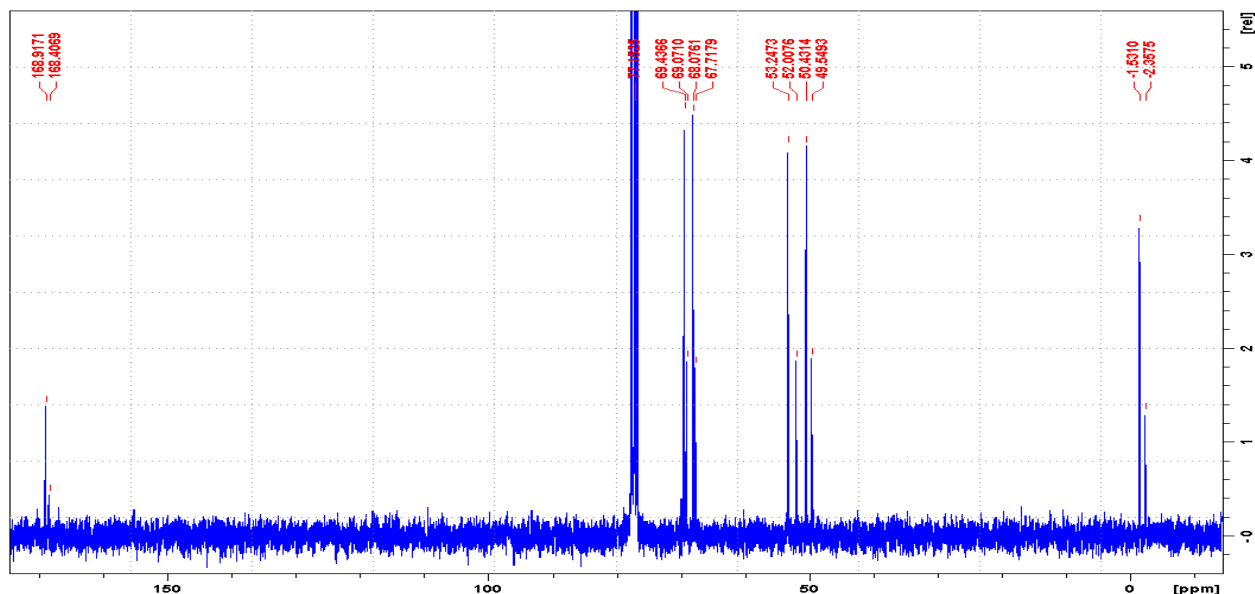
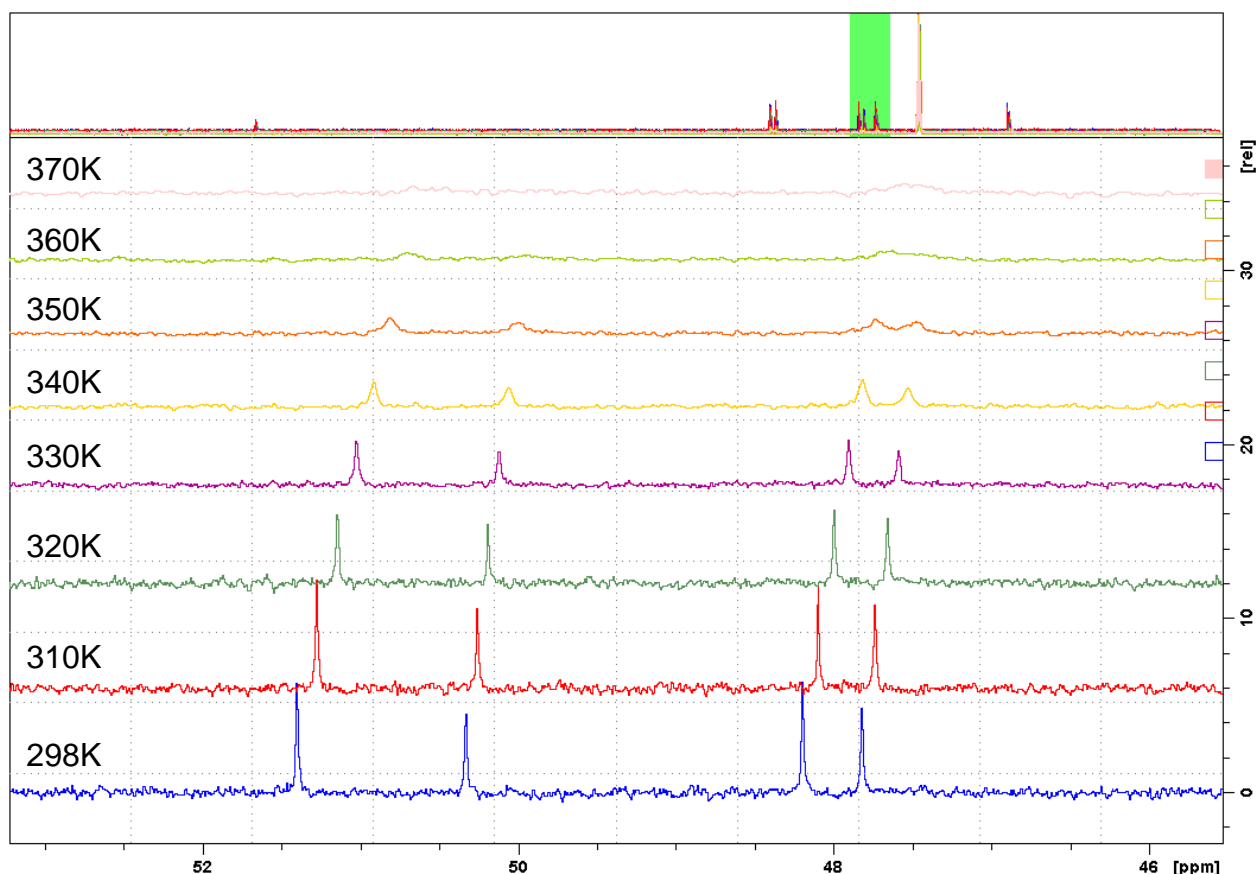


Abb. 3.1:  $^{13}\text{C}$ -NMR von **61** in  $\text{CDCl}_3$ .

Es wurden Temperaturmessungen in  $\text{DMSO}-d_6$  von  $25\text{ }^\circ\text{C}$  bis  $97\text{ }^\circ\text{C}$  in  $10\text{ K}$ -Schritten unternommen. Abb. 3.2 zeigt die Messungen. Es ist klar zu erkennen, wie die Peaks bei erhöhter Temperatur immer weiter zusammenfallen, allerdings konnte der Koaleszenzpunkt nicht erreicht werden. Dieses Verhalten lässt auf *head-to-head* und *head-to-tail* Konformationen des Diamids schließen und bestätigte die Reinheit des Produkts, sowie eine ungefähre 2:1 Aufteilung der Konformere. Dasselbe Konformeren-Gemisch wurde auch bei allen anderen Diazakronen festgestellt.

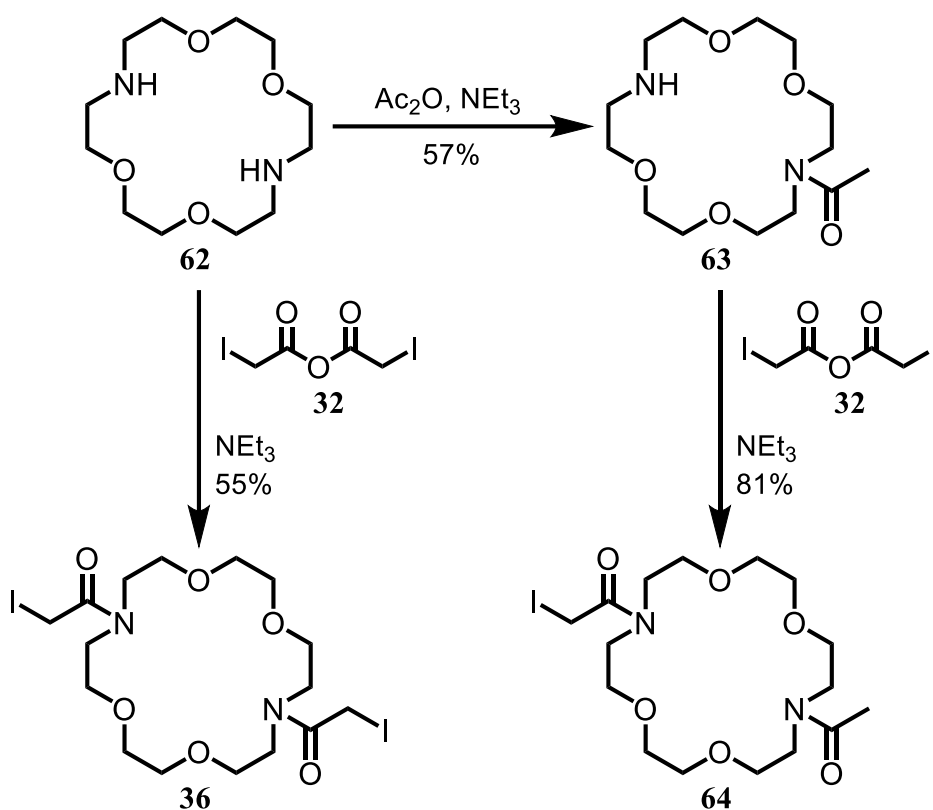


**Abb. 3.2:**  $^{13}\text{C}$ -NMR Messungen von **61** bei verschiedenen Temperaturen. Die Signale konvergieren mit Erhöhung der Temperatur. Die Aufspaltung der Peaks ist auf Head-to-Head und Head-to-Tail Konformationen der Acetamide zurückzuführen.

Die Herstellung des Bisiodacetamids aus 1,10-Diaza-18-Krone-6 (**62**) erfolgte analog zu **35**. Umsatz mit Iodessigsäureanhydrid **32** und Triethylamin ergab Verbindung **36** in mäßiger Ausbeute. Jeglicher Versuch der Optimierung über Temperatur oder Zeit brachte keine Verbesserung der Ausbeute. Ausbeuten über 70% werden im Regelfall nur durch Verwendung von Säurechloriden<sup>[92, 93]</sup> oder Reaktionen mit Mikrowellen<sup>[94]</sup> erreicht. Diese Bedingungen sind für die Herstellung von Iodacetamide allerdings nicht geeignet.

Ein entsprechendes Monoiodacetamids **64** sollte für einen Testumsatz mit OmpG hergestellt werden. Hiermit sollte getestet werden, ob ein Unterschied in der SDS-PAGE zwischen quervernetzen und doppelter Monofunktionalisierung zu erkennen ist.

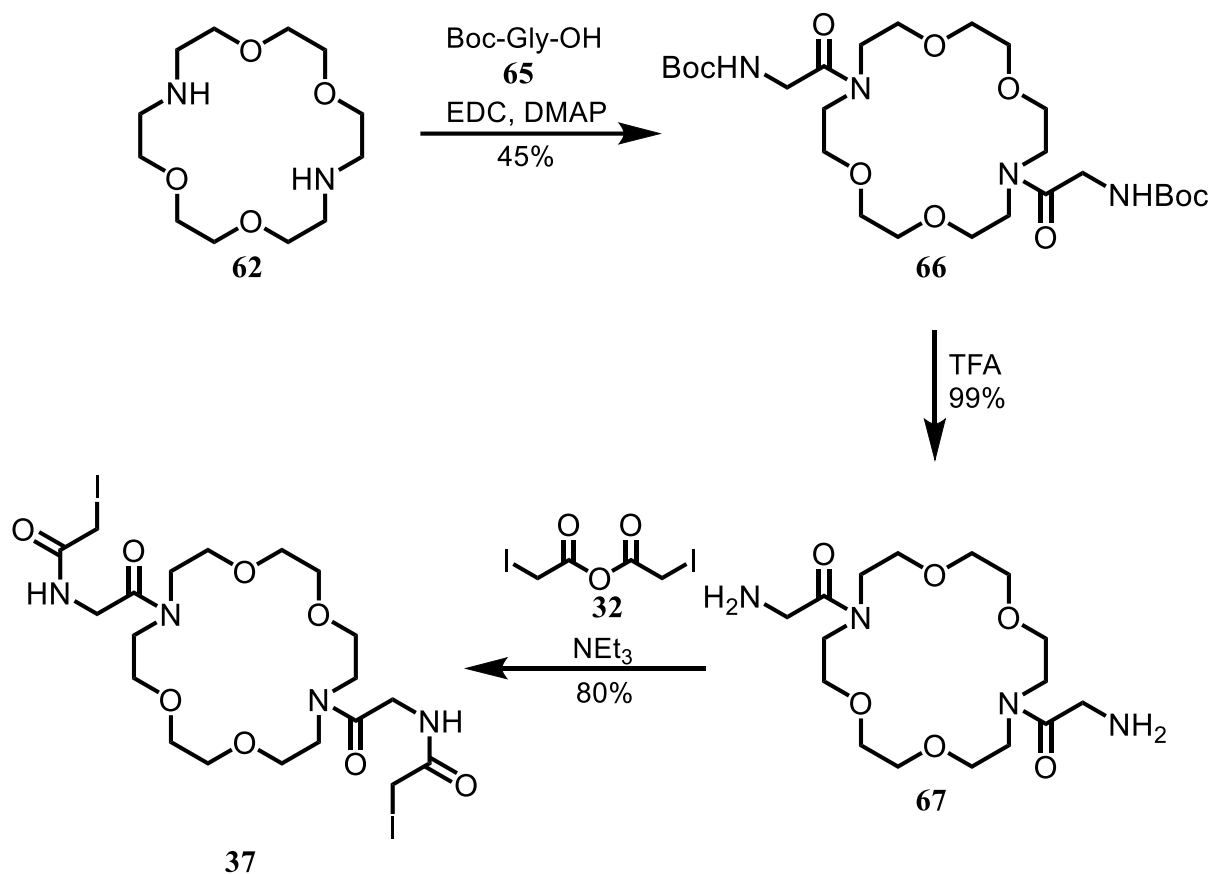
Die Darstellung des Monoiodacetamids **64** begann mit der Monoacetylierung der Azakrone **62** mit Essigsäureanhydrid und Triethylamin. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde Monoacetylkrone **63** mit 57% Ausbeute erhalten und anschließend mit Iodessigsäureanhydrid (**32**) und Triethylamin mit 81% Ausbeute in Verbindung **64** überführt (Schema 26).



**Schema 26:** Darstellung des Bisiodacetamids **36** und des Monoiodacetamids **64**.

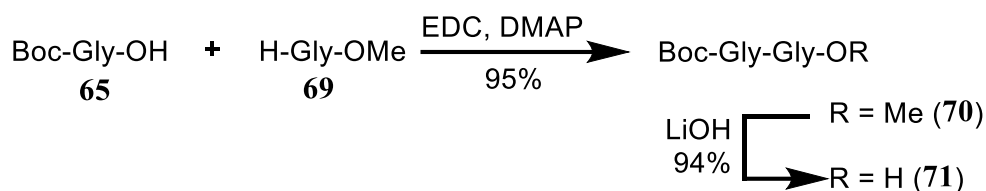


Die Synthese des Glyciniodacetamids **37** begann mit der Aktivveresterung von kommerziell erhältlichem Boc-geschütztem Glycin **65** und **62** mittels EDC und DMAP. Nach wässriger Aufarbeitung wurde Biscarbamat **66** mit mäßiger Ausbeute erhalten. Entschützung der *tert*-Butylcarbamate mit TFA ergab nach Entfernen des Lösungsmittels das Diamin **67** in beinahe quantitativer Ausbeute. Mit Iodessigsäureanhydrid **32** und Triethylamin wurde in guter Ausbeute das Glyciniodacetamid **37** nach Säulenchromatographie erhalten (Schema 27).



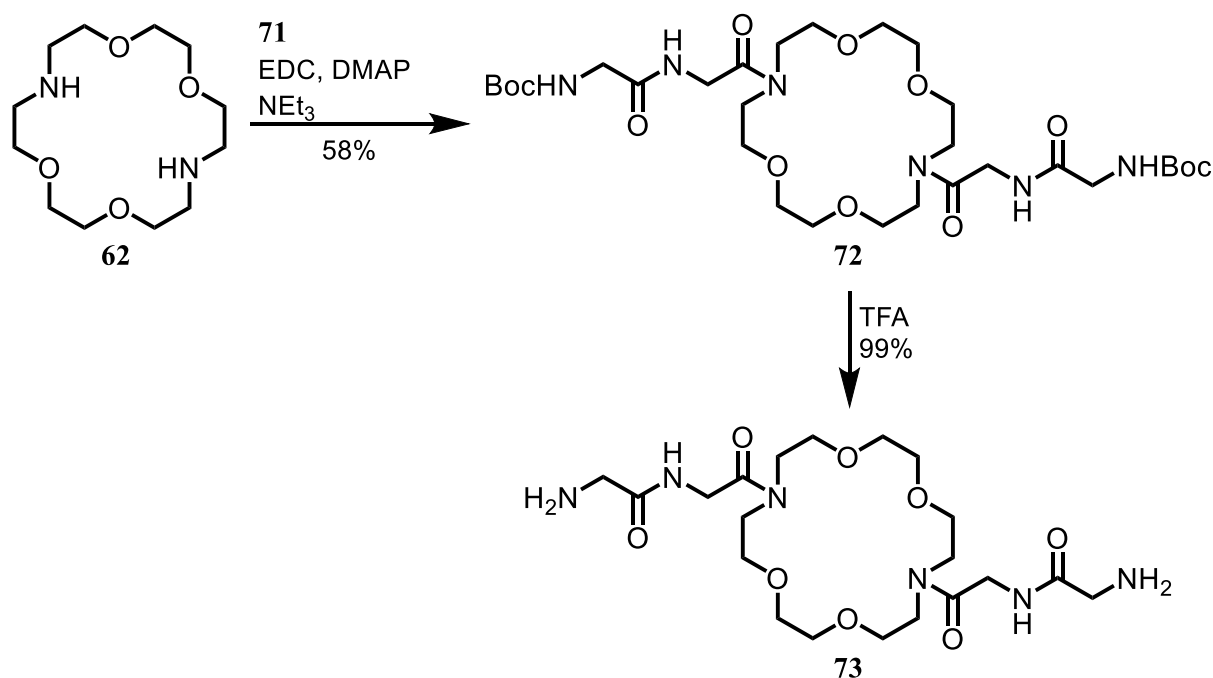
Schema 27: Synthese der mit Glycin verlängerten Bisiodacetamidkrone **37**.

Schema 28 zeigt den Beginn der Synthese der Dipeptid-Diazakrone **73** mit der Herstellung des Diglycins **71**. Eine EDC/DMAP-vermittelte Kupplung von Boc-Gly-OH (**65**) mit H-Gly-OMe (**69**) ergab den Methylester **70** in sehr guter Ausbeute. Eine Methylesterspaltung mit LiOH lieferte nach wässriger Aufarbeitung das gewünschte Diglycin **71**.<sup>[95]</sup>



**Schema 28:** Synthese des Diglycins **71**.

Diazakrone **62** wurde mit der Säure **71** mittels EDC und DMAP gekuppelt, um das Biscarbamat **71** in hinreichender Ausbeute zu erhalten, wie in Schema 29 gezeigt. Reaktion mit TFA in Dichlormethan lieferte das freie Bisamin **73** in nahezu quantitativer Ausbeute. Vom Umsatz zum Bisiodoacetamid der Verbindung **73** wurde abgesehen, da die Ergebnisse der Reaktion von **37** mit OmpG noch ausstanden und Iodoacetamide nicht unbegrenzt lagerbar sind.

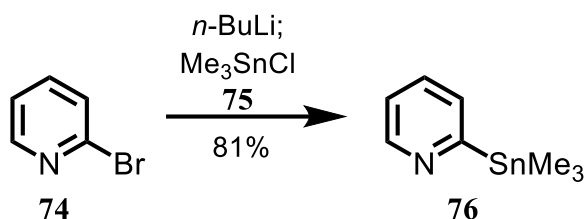


**Schema 29:** Darstellung der Dipeptid-Diazakrone **73**.

### 3.1.4 Synthese von Bipyridinen zur doppelten Ein-Punkt-Anknüpfung

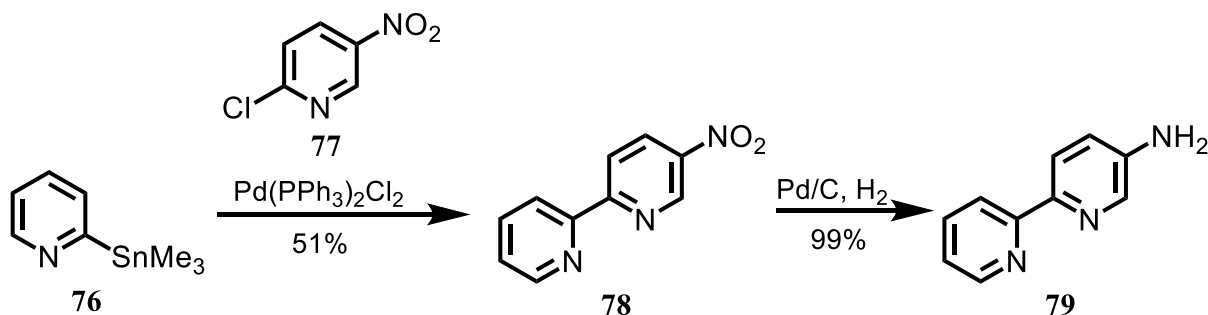
Es sollten zwei unterschiedliche Bipyridin-Derivate hergestellt werden, die sich vorwiegend in der Länge des Iodacetamid-Linkers unterscheiden. Hierzu wurden Bipyridine auf Basis von Aminobipyridin **79** und Benzylether **86** synthetisiert.

Aminobipyridin **79** wurde nach einer modifizierten Synthese von *B. Zhang*<sup>[96]</sup> hergestellt. 2-Brom-pyridin (**74**) wurde mit *n*-BuLi lithiiert und mit Trimethylzinnchlorid **75** in guter Ausbeute in das Stannan **76** überführt (Schema 30).



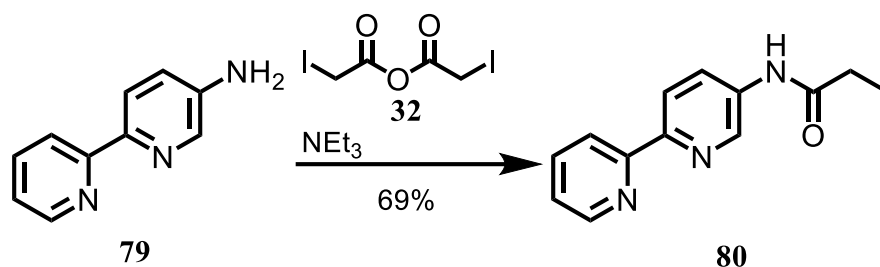
**Schema 30:** Darstellung des Trimethylstannans **76** nach *Zhang et al.*<sup>[96]</sup>

Wie in Schema 31 gezeigt, wurde **76** in einer STILLE-Kupplung mit dem Chlorid **77** umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte das Nitrobipyridin **78** in mäßiger Ausbeute erhalten werden. Eine Reduktion der Nitro-Funktion mit Palladium auf Kohle und Wasserstoff führte zum Amin **79** in nahezu quantitativer Ausbeute. Bei dieser Reduktion musste immer ein Tropfen Säure zugegeben werden, da ansonsten nur eine hoch komplexe Mischung erhalten wurde.



**Schema 31:** Darstellung desamins **79**.

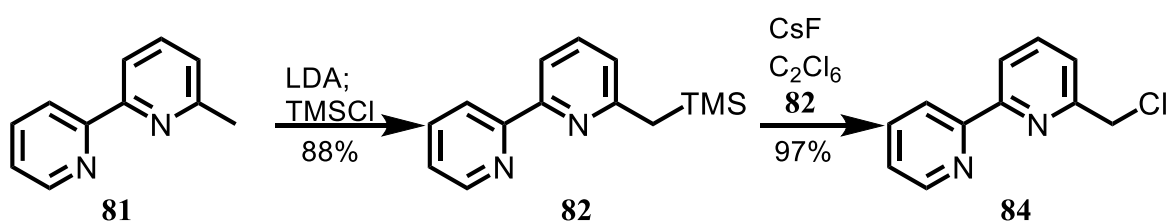
Umsetzung des Amins **79** mit **32** gab das gewünschte Iodacetamid **80** in guter Ausbeute (Schema 32).



**Schema 32:** Darstellung des Iodacetamids **80**.

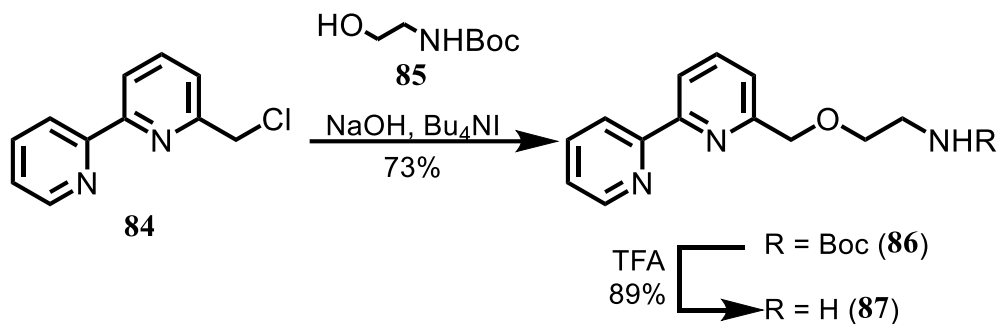
Da direkte Halogenierungen von Methylbipyridinen sehr komplexe Mischungen von halogenierten Verbindungen bilden<sup>[97]</sup>, wurde der Grundkörper für Bipyridin **87** nach einer Vorschrift von *Fraser et al.*<sup>[98]</sup> hergestellt, in der zunächst ein Silylmethylbipyridin **82** hergestellt wird, bevor es zu einem Silyl-Halogen austausch kommt.

Bipyridin **81** wurde mit *in situ* hergestelltem LDA deprotoniert und das Anion mit TMSCl gequenchet um Silan **82** zu erhalten. Bei dieser Reaktion ist die Reaktionsdauer mit dem TMSCl von entscheidender Bedeutung, da es bei zu langer Reaktion zu Übersilylierung kommen kann. **82** wurde mit CsF und Hexachlorethan **83** in das Chlorid **84** mit 85% Ausbeute über zwei Stufen überführt (Schema 33).



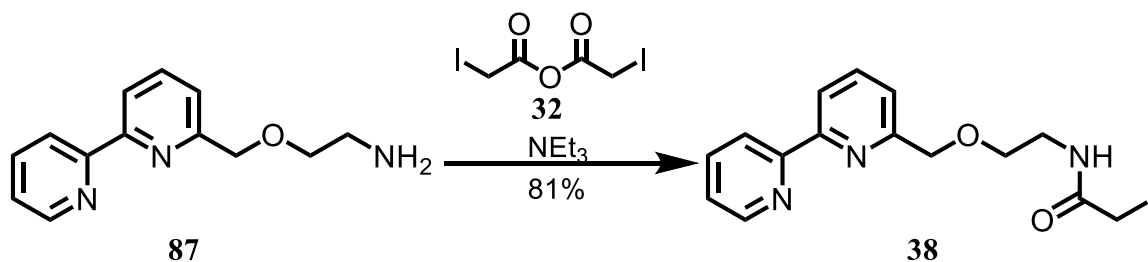
**Schema 33:** Herstellung des Chlorids **84**.

Chlorid **84** wurde mittels einer Phasentransferkatalyse mit Verbindung **85** in den Ether **86** überführt. Behandlung mit TFA und anschließender basischer Aufarbeitung lieferte das freie Amin **87** mit 65% Ausbeute über zwei Stufen (Schema 34).



Schema 34: Synthese des Amins **87**.

Reaktion von **87** mit **32** ergab Iodacetamid **38** in guter Ausbeute nach säulenchromatographischer Aufreinigung, wie in Schema 35 gezeigt.



Schema 36: Darstellung des Iodacetamids **37**.

---

## **3.2. Native chemische Ligation von VDAC**

Der N-Terminus von mVDAC, der die  $\alpha$ -Helix bildet, besteht aus 25 Aminosäuren. Drei von diesen sind die Glycine G10, G21 und G25. Solche Glycine eignen sich hervorragend als Schnittpunkte für eine native chemische Ligation (NCL) mit einem synthetisierten beziehungsweise mit einem künstlich modifizierten Peptid.

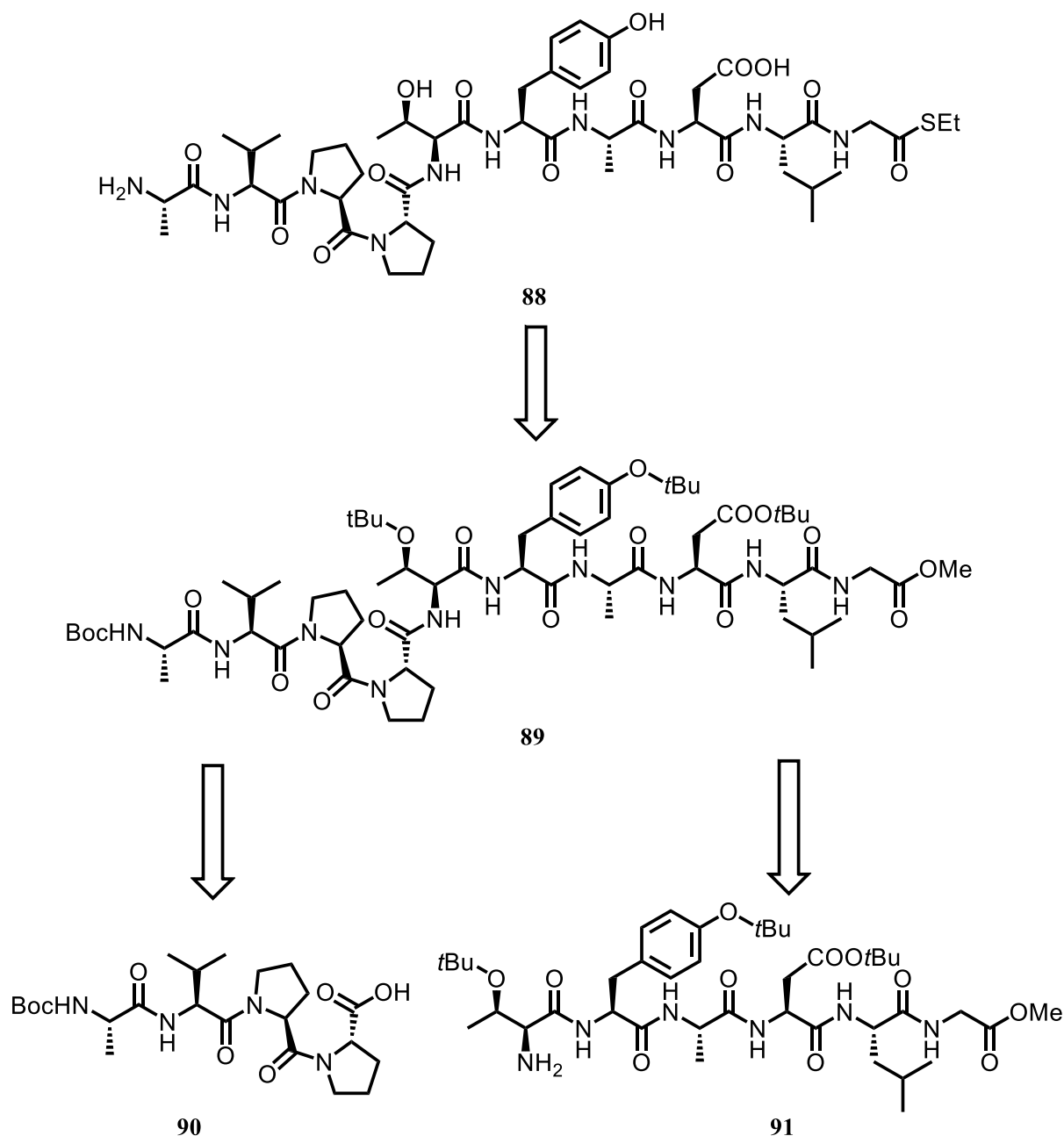
Von der AG *Essen* von der Philipps-Universität Marburg wurde die Mutante  $\Delta 10K11C$  hergestellt. An Position 11 wurde bei dieser Mutante das Lysin gegen ein Cystein für eine native chemische Ligation ausgetauscht und die Aminosäuren Eins bis Zehn deletiert.<sup>[100, 101]</sup>

Zur Herstellung dieses Peptids wurden zwei Wege verfolgt: zum Einen die *Solid Phase Peptide Synthesis* (SPPS), bei der ein Peptid linear an einem Harz aufgebaut wird und zum Anderen die Fragmentsynthese, bei der einzelne, größere Peptidfragmente über Aktivveresterung hergestellt werden welche später sukzessive miteinander verbunden werden. Im Folgenden wird zuerst auf die Fragmentsynthese und anschließend auf die automatisierte SPPS eingegangen.

### **3.2.1 Retrosynthese des Decamers **88****

Um das Decamer in möglichst hoher Reinheit für die NCL zu erhalten und später einfache Derivatisierung zu ermöglichen, sollte der Aktivester **88** über Fragmentsynthese in Lösung synthetisiert werden. Eine Variation der einzelnen Fragmente sollte dadurch zu einer Vielzahl an Peptiden für die NCL führen.

Der entschützte Aktivester **88** lässt sich zurückführen auf das komplett geschützte Decamer **89**, bei dem die Carbonsäure als Methylester vorliegt, welche orthogonal zu den anderen, säurelabilen Schutzgruppen abspaltbar ist. **89** lässt sich aufbauen aus dem Tetramer **90** und dem Hexamer **91** (Schema 36).



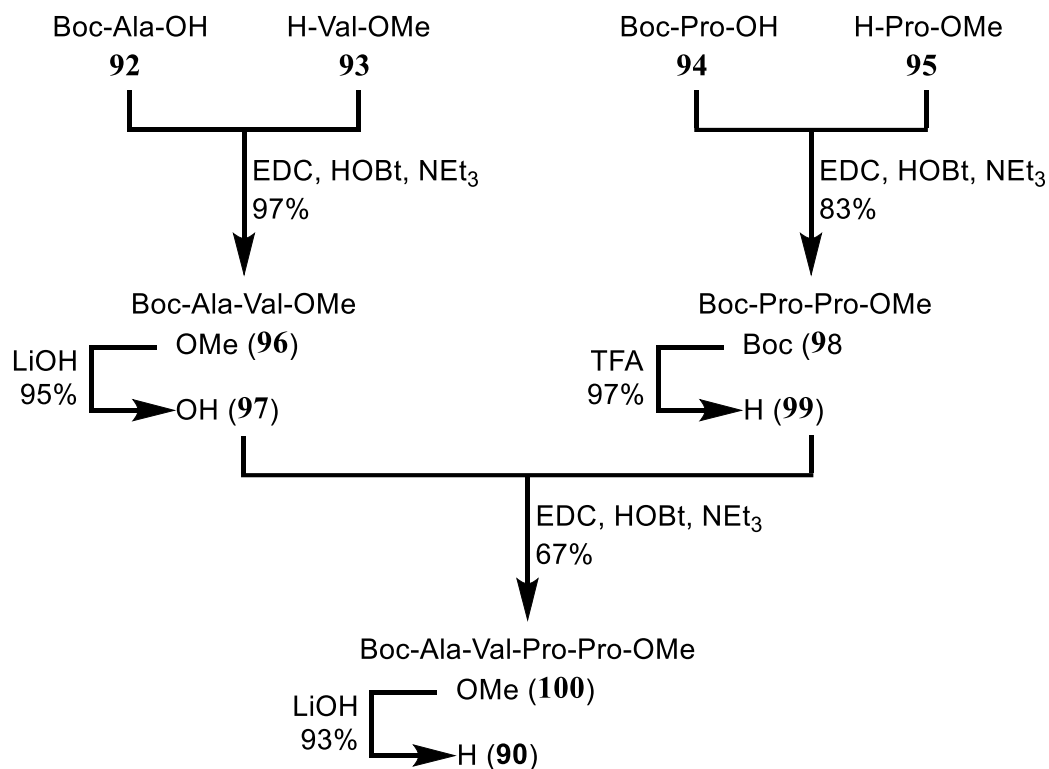
**Schema 36:** Retrosynthese der des Decamers **88**.

Schutzgruppe der Wahl war auf dem C-Terminus der Methyl ester, welcher leicht und ohne Epimerisierung mit LiOH in einer Wasser/THF-Mischung abgespalten werden konnte. Die Reste der Aminosäuren Threonin, Tyrosin und Asparaginsäure waren *tert*-Butyl geschützt. Auf dem N-Terminus hatten sich Carbamatschutzgruppen wie *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc)-, Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc)- und Benzyloxycarbonyl (Cbz)-Schutzgruppen bewährt. Waren keine seitenkettengeschützten Aminosäuren vorhanden, wurde die Boc-Schutzgruppe gewählt. War dies nicht der Fall wurde auf Fmoc oder Cbz zurückgegriffen, damit der N-

Terminus in Gegenwart der säureempfindlichen *tert*-Butyl-Gruppen geschützt werden konnte.

### 3.2.2 Synthese des Tetramers 90

Ausgehend von Boc-Ala-OH (**92**) und H-Val-OMe (**93**) wurde mittels einer Aktivveresterung mit EDC, HOBt und Triethylamin das Dipeptid **96** hergestellt, welches mit LiOH entschützt wurde und nach wässriger Aufarbeitung die reine Säure **97** ergab. Das Dipeptid **98** konnte bei 40 °C unter Aktivesterbedingungen aus Boc-Pro-OH (**94**) und H-Pro-OMe (**95**) hergestellt werden. Wie die NMR-Analyse zeigte, wurde eine Mischung aus *s-cis/s-trans* Konformeren (Rotamere) erhalten, wie auch schon in der Literatur vermerkt wurde.<sup>[99]</sup> Entschützung des N-Terminus mit TFA ergab das Ammoniumsalz **99**. **97** und **99** wurden erneut mittels EDC und HOBt gekuppelt, wobei der sterische Anspruch des Prolins die Kupplung zu Tetrapeptid **100** erschwerte. Entschützung des C-Terminus mit LiOH ergab das kupplungsbereite Tetramer **90** als Rotamerengemisch (Schema 37).

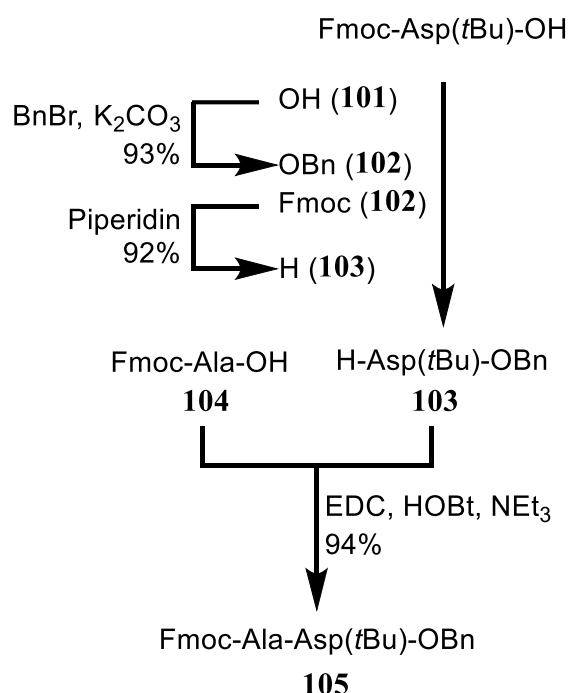


Schema 37: Synthese des Tetramers **90** ausgehend von den Dimeren **96** und **98**.



### 3.2.3 Synthese des Hexamers 91

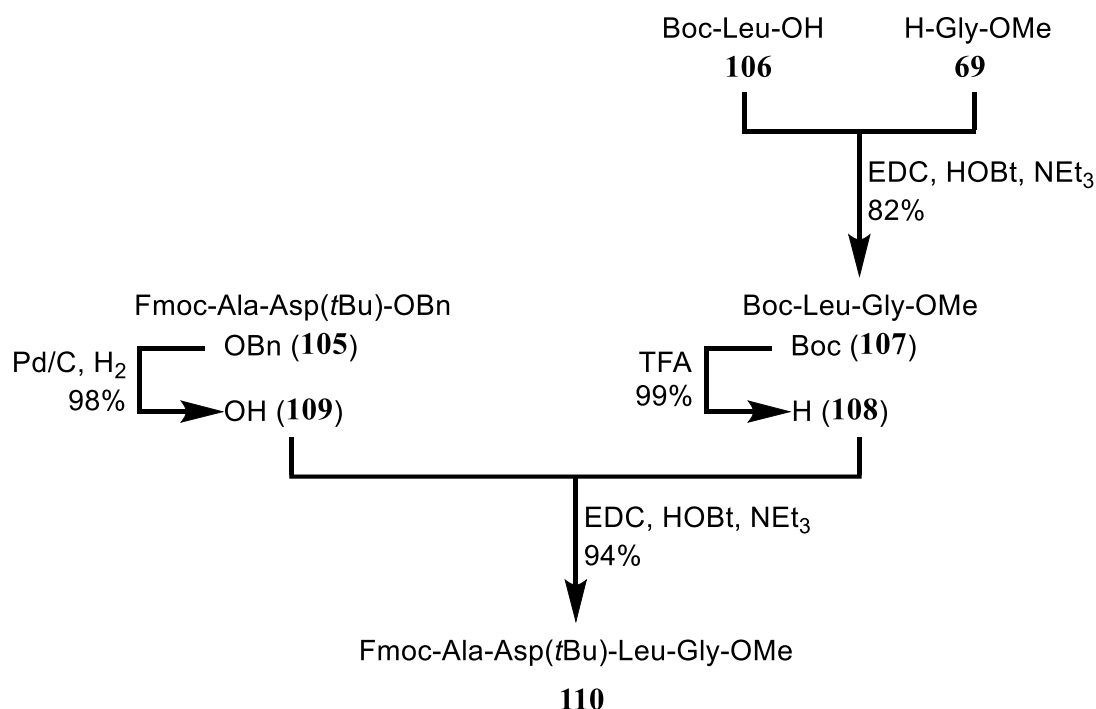
Ausgehend von Fmoc-Asp(*t*Bu)-OH (**101**) wurde dies mit Kaliumcarbonat und Benzylbromid in den Benzylether **102** überführt<sup>[104]</sup> und anschließend die Fluorenylmethoxycarbonyl-Funktion mit 20% Piperidin in DMF entschützt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde H-Asp(*t*Bu)-OBn (**103**) in guter Ausbeute erhalten. Kupplung von **104** mit Fmoc-Ala-OH (**104**) mittels EDC, HOBt und Triethylamin ergab das Dipeptid **105** in 80% Ausbeute über drei Stufen (Schema 38).



**Schema 38:** Synthese des Dipeptids **105**.

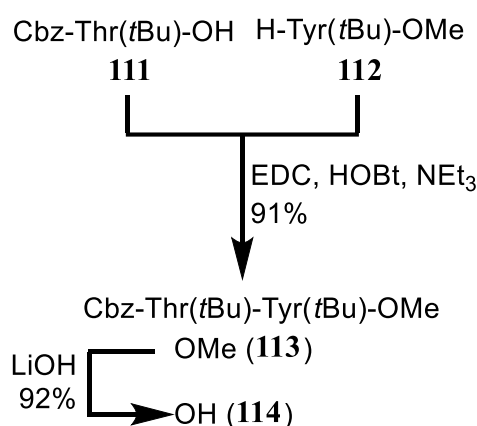
Boc-Leu-OH (**106**) und Glycinmethylester (**69**) ergaben nach Aktivveresterung das Dipeptid **107**. Entschützung des N-Terminus mit TFA ergab in nahezu quantitativer Ausbeute das Dimer **108**.

Eine Hydrierung von **105** mit Palladium auf Kohle in Methanol gab nach Filtration und Entfernen des Lösungsmittels die freie Säure **109**, wie in Schema 39 gezeigt. Aktivveresterung von Dimer **108** mit der Säure **109** ergab in guten Ausbeuten das geschützte Tetramer **110**. Die Reaktionszeit durfte hierbei nicht länger als vier Stunden betragen, da sonst die Fmoc-Schutzgruppe zum Teil abgespalten wurde und es zu Polymerisation kam.



**Schema 39:** Synthese des Tetramers **110**.

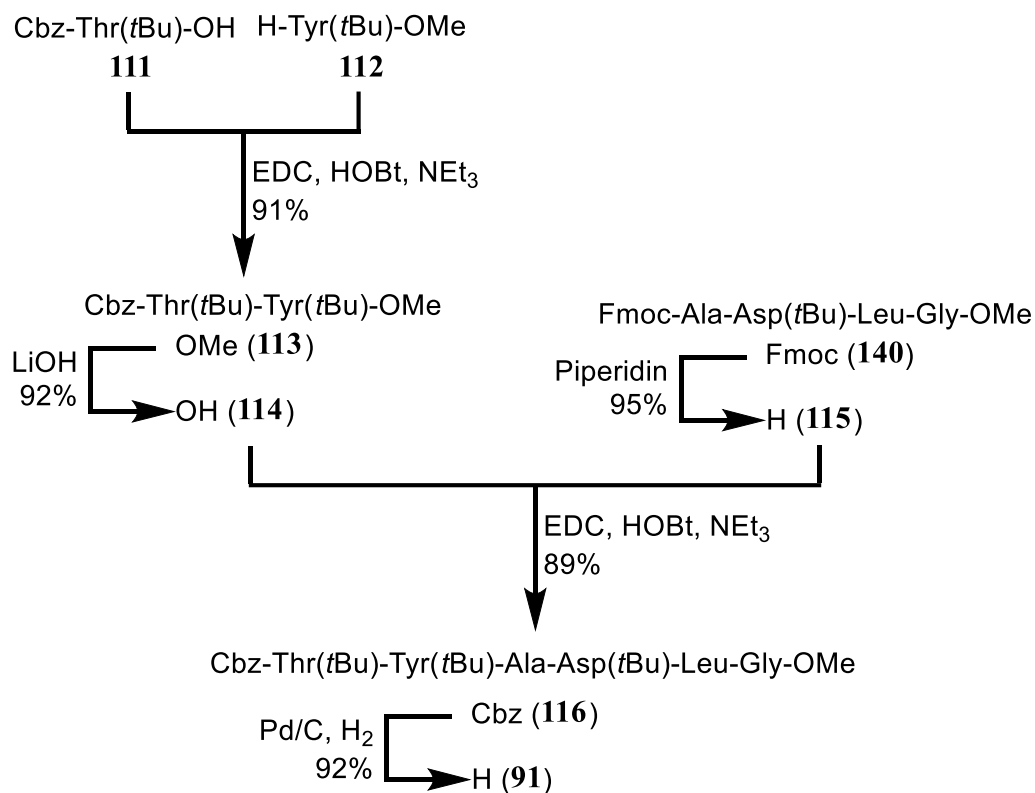
Zur Herstellung des Hexamers **91** wurde das Dipeptid **113** EDC/HOBt-vermittelt aus den Monomeren H-Tyr(*t*Bu)-OMe (**111**) und Cbz-Thr(*t*Bu)-OH (**112**) hergestellt, wie in Schema 26 zu erkennen ist. **111** wurde hierbei als Dicyclohexylamin-Salz gekauft und wurde vor der Reaktion mit 1 M wässriger NaHSO<sub>4</sub> gewaschen um die freie Säure zu erhalten. Das Dipeptid **113** wurde mit LiOH innerhalb von drei Stunden in die freie Säure **114** überführt.



**Schema 40:** Darstellung des Dipeptids **114**.

Entschützen des Tetramers **110** mit Piperidin in DMF ergab das Amin **115**, welches mittels EDC und HOBt mit der Säure **114** gekuppelt wurde, um das geschützte Hexamer **116** zu erhalten. Kupplungsversuche mit HBTU oder HATU brachten keine Verbesserung der

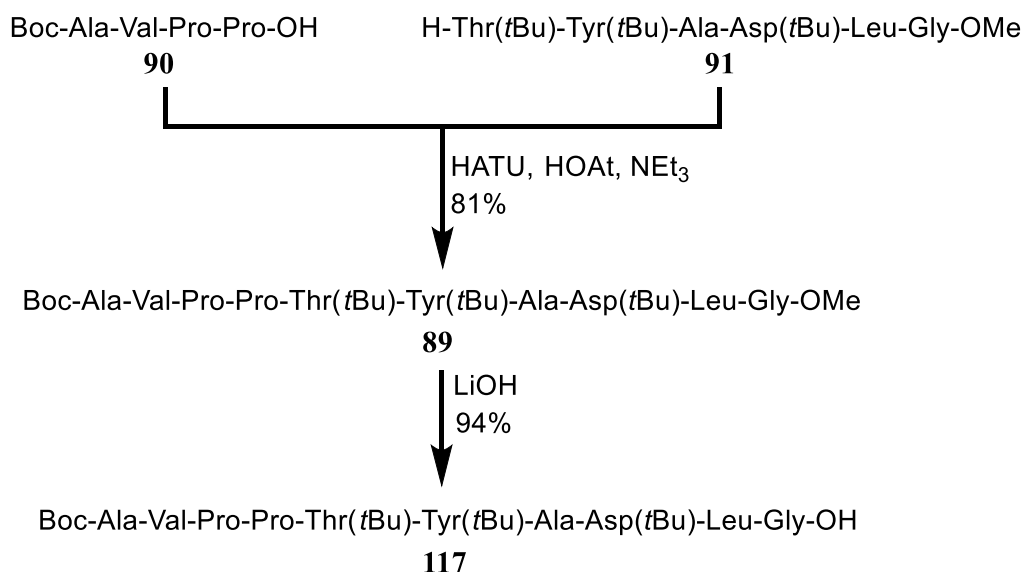
Ausbeute. Hydrierung der Cbz-Gruppe von **116** mit Palladium auf Kohle ergab das gewünschte Hexapeptid **91** in guter Ausbeute (Schema 41).



**Schema 41:** Darstellung des N-terminal entschützten Hexamers **91**.

### 3.2.4 Herstellung des Decamers **88** und Entschützung zu **117**

Die Kupplung des Tetramers **90** mit dem Hexamer **91** erfolgte mit dem Reagenziengemisch HATU/HOAt und ergab in guten Ausbeuten das Decapeptid **89**. Kupplungsversuche mit den unreaktiveren Reagenzien EDC/HOBt oder HBTU/HOBt ergaben **89** lediglich in Ausbeuten bis zu 25%. Entschützen des Methylesters mit LiOH ergab in guten Ausbeuten das Decamer **117** (Schema 42).



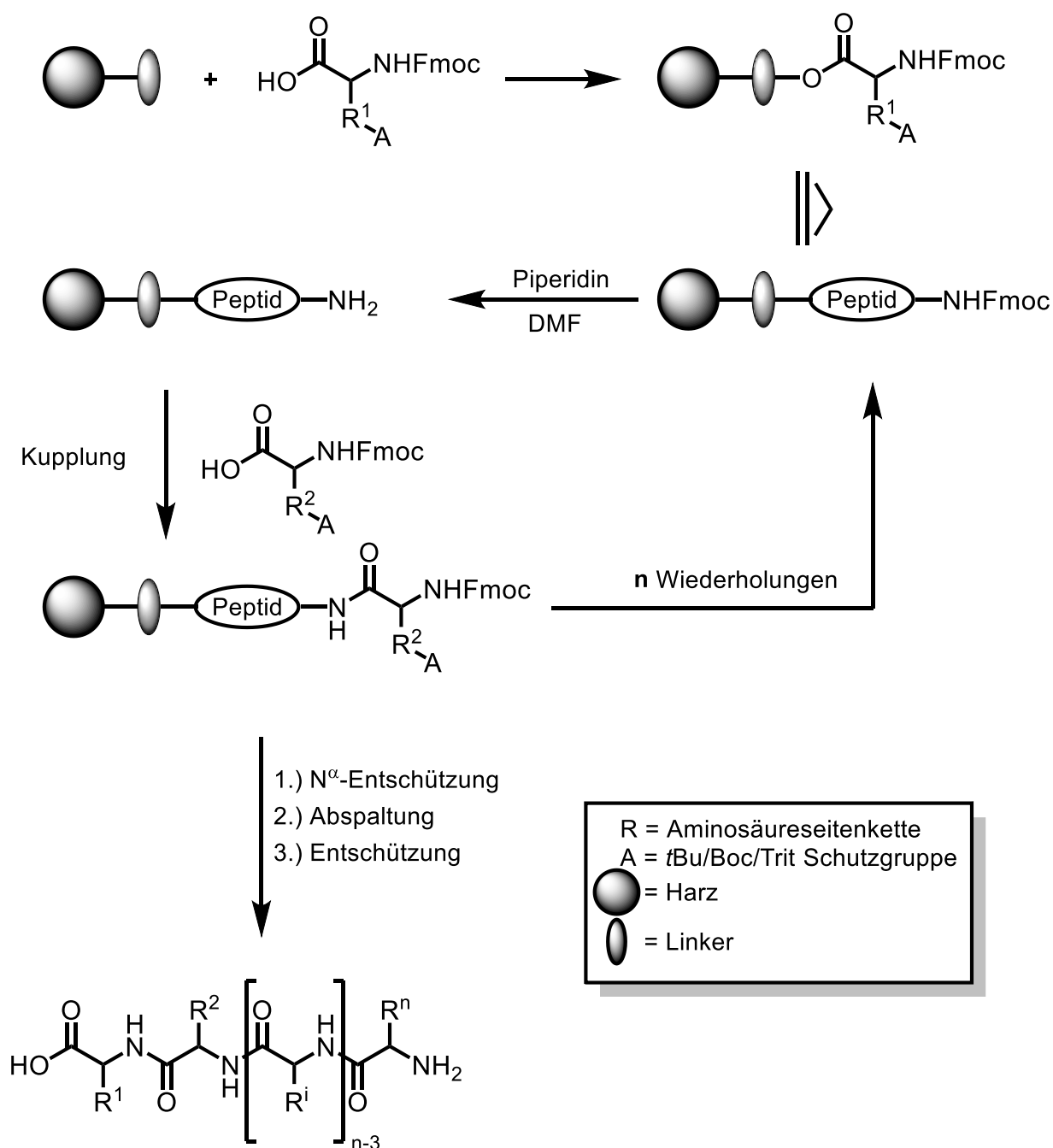
**Schema 42:** Synthese des geschützten Decamers **89** und Methylesterentschüttung zu **117**.

### 3.2.5 Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS)

Zur Herstellung des Decamers **88** über SPPS wurde die Fmoc-Strategie verwendet. Diese zeichnet sich dadurch aus, dass die hierbei verwendeten Aminosäuren am N<sup>α</sup> mit der im basischen schnell abzusplittenden Fmoc-Schutzgruppe versehen sind. Die Seitenketten sind orthogonal dazu geschützt und meistens mit säurelabilen Schutzgruppen wie zum Beispiel Boc oder Trityl versehen. Das Peptid wird linear an einem unlöslichen Harz synthetisiert. Die erste Aminosäure wird an die Linker auf dem Trägerpolymer kovalent gebunden und, nach Entschüttung der N<sup>α</sup>-Schutzgruppe, wird die nächste Aminosäure an das Peptid gekuppelt. Daraufhin wird erneut die N<sup>α</sup>-Schutzgruppe entfernt und erneut gekuppelt. Diese Schritte werden so lange wiederholt bis das Peptid die gewünschte Länge *n* nach *n* Cyclen erreicht hat. Die Fmoc-Strategie ist allerdings nicht die einzige Methode für eine SPPS. Die ersten Arbeiten auf dem Gebiet der SPPS wurden 1963 von R. B. Merrifield geleistet.<sup>[105]</sup> Die hierbei verwendeten Aminosäuren waren mit unterschiedlich säurelabilen Schutzgruppen versehen. Am N<sup>α</sup> wurden Boc-Schutzgruppen verwendet, die nach jedem Kupplungsschritt mit TFA abgespalten wurden. Die anderen, dauerhaften Schutzgruppen wurden zum Schluss mit wasserfreiem Hydrogenfluorid entschüttet, was dazu führt, dass man spezielle Ausrüstung für diese SPPS benötigt.

Da das Peptid an ein unlösliches, polymeres Trägerharz gebunden ist, verläuft jeder einzelne Kupplungsvorgang analog zu dem Vorherigen und die Reinigung kann durch simples

Waschen des Harzes erfolgen. Ein gewöhnlicher Ablauf eines einzelnen Kupplungsschritts besteht aus dem Kupplen einer Aminosäure, Waschen des Harzes, Entschützen der N<sup>α</sup>-Schutzgruppe und erneutes Waschen. Danach wird die nächste Aminosäure gekuppelt bis das Peptid die gewünschte Länge erreicht hat. Dieser repetitive Ablauf ermöglicht es somit auch große Peptide durch einen Roboter herzustellen. Schema 43 zeigt schematisch den Ablauf der Fmoc-SPPS.

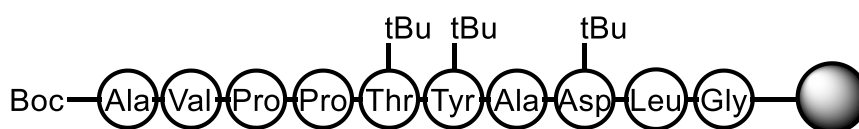


**Schema 43:** exemplarischer Ablauf einer Fmoc-SPPS. Nach der Fmoc-Entschützung kann die nächste Aminosäure analog gekuppelt werden.

---

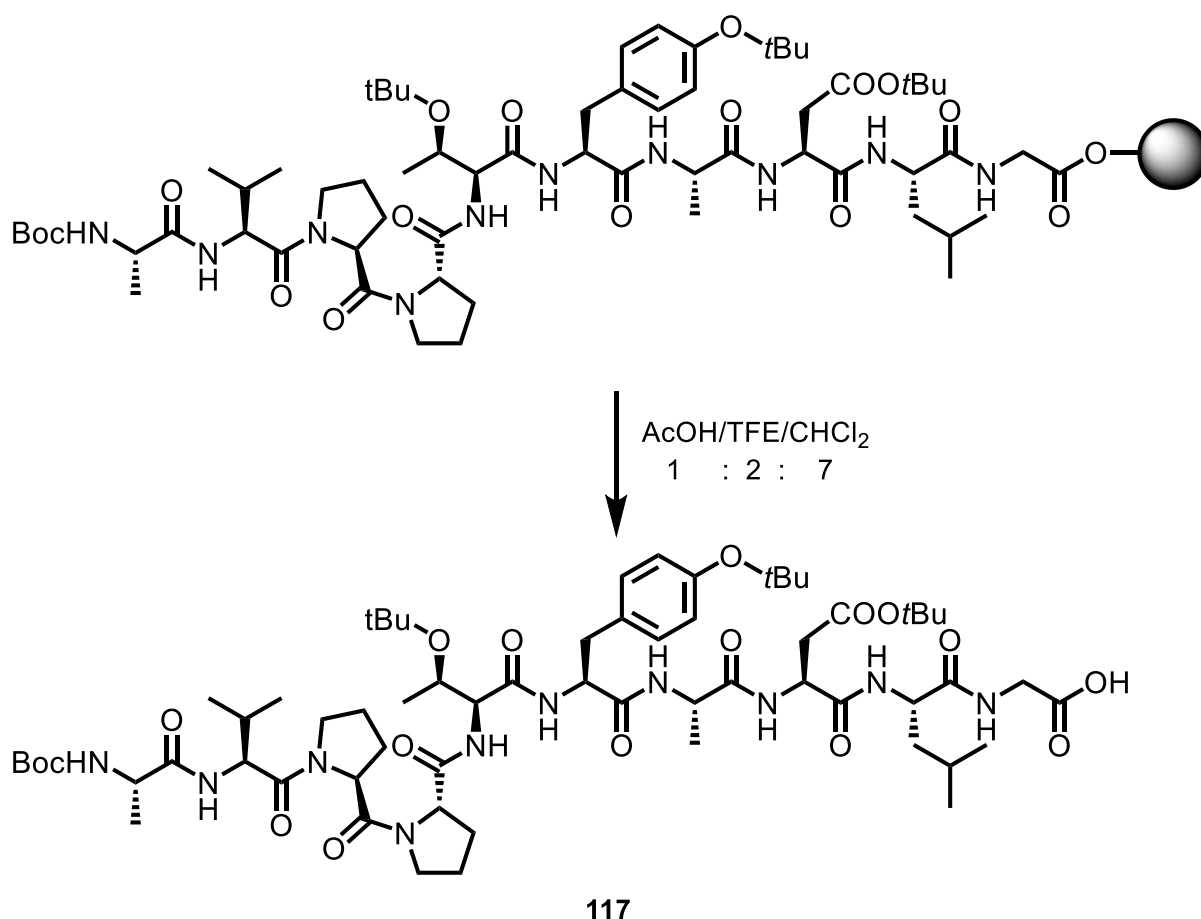
Die Kupplungsreaktionen verlaufen bei allen SPPS über eine Aminolyse reaktiver Carbonsäurederivate, welche entweder direkt Carbonsäurechloride sind oder erst durch Kupplungsreagenzien hergestellt werden. Meistens werden Kupplungsreagenzien auf Basis von Carbodiimid-, Uronium oder Phosphoniumreagenzien verwendet. Als Hilfsbase werden tertiäre Amine verwendet und als Additive werden Hilfsnukleophile wie zum Beispiel HOAT verwendet, welche eine Epimerisierung des  $\alpha$ -Stereozyentrums und einen N-Acyl-Shift verhindern.

Das hier für die Fmoc-SPPS verwendete Trägermaterial war ein mit 1% Divinylbenzol vernetztes Polystyrol-Harz, welches mit 2-Chloro-Tritylgruppen als Linker versehen war. Das Harz wurde mit an die Linker gebundenen Glycin erworben. Peptide, welche an diese Trityllinker gebunden sind, lassen sich, analog zu den Tritylschutzgruppen, im sauren vom Harz abspalten. Aus diesem Grund wurden für die Festphasensynthese säureempfindliche Schutzgruppen für die Seitengruppen gewählt. Weiterhin wurde als letzte Aminosäure Boc-Ala-OH zur Kupplung gewählt, wodurch es ermöglicht wird das Peptid vom Harz abzuspalten und gleichzeitig zu entschützen. Schema 44 zeigt das an der Festphase hergestellte Peptid mit den entsprechenden Schutzgruppen. Zur Einfachheit wird in den nächsten Abbildungen darauf verzichtet den Linker in den Schemata zu zeigen.



**Schema 44:** An das Harz gebundene, über Fmoc-SPPS hergestellte Peptid mit den entsprechenden Schutzgruppen.

Da das Peptid allerdings für die NCL als Thioester benötigt wurde, konnte eine Abspaltung vom Harz nicht gleichzeitig mit der Entschützung der permanenten Schutzgruppen erfolgen. Folglich wurde das Peptid erst unter mild sauren Bedingungen vom Harz abgespalten und sollte dann in den Thioester überführt werden, um anschließend alle Schutzgruppen im stark sauren abzuspalten. Schema 45 zeigt die Abspaltung vom Harz. Die Ergebnisse der Thioester-Herstellung, sowie ein kritischer Vergleich der Festphasensynthese gegenüber der Fragmentsynthese finden sich in Kapitel 4.2.



Schema 45: Saures Abspalten vom Harz unter Erhalt der säurelabilen Schutzgruppen.

### 3.3 Darstellung von rekombinantem Protein

Die Expression und Umsetzungen von OmpG mit organischen Molekülen wurden von *Dr. W. Grosse* und *Dr. G. Psakis* aus der AG Essen der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Für die Umsetzung des Sulfonats **59** wurde OmpG/ $\Delta$ l6/C13/C154 frisch von mir exprimiert und umgesetzt. Hierbei handelt es sich um eine OmpG-Mutante mit zwei Cysteinen und deletierten L6-loop, damit das Porin in BLM-Messungen ruhiger erscheint. Als Grundlage für dieses Mutante wurde der pET20b(+)-Vektor (*Novagen*, Merck KGaA, Darmstadt) verwendet.<sup>[102]</sup> Das Porin wurde zusammen mit *G. Psakis* wie zuvor beschrieben aufgereinigt.<sup>[73]</sup>

---

### 3.3.1 Transformation in chemisch kompetente Zellen

Zellen können in der Natur „fremde“ DNA durch die Zellmembran aufnehmen. Bei prokaryotischen Zellen heißt dieser Vorgang Transformation und ist im Regelfall sehr ineffizient. Um diesen Vorgang für Laborarbeiten praktikabel zu machen, wurden verschiedene Methoden entwickelt um einen DNA-Transfer in kompetente Zellen zu ermöglichen. Eine Methode davon ist die Hitzeschock-Transformation, die hier angewendet wurde.<sup>[103]</sup>

Die chemisch kompetenten Zellen wurden in der AG Essen nach einer Vorschrift von W. Große hergestellt<sup>[22, 109]</sup> und es wurden für die Re-Transformation in die kompetenten Zellen nur Zellen des Stammes *Escherichia coli* BL21 (DE3) omp9 mit dem Plasmid pET20-OmpG<sub>m</sub> verwendet, der von Koebnik *et al.* konstruiert wurde.<sup>[113]</sup>

Für die Transformation wurden 1.0 µL des Plasmids zu 50 µL einer Zellsuspension bei 0 °C gegeben und 5 – 10 min auf Eis inkubieren lassen. Die Suspension wurde für 1.5 min in einem Wasserbad auf 42 °C erhitzt und anschließend sofort 2 min auf Eis gekühlt. Es wurden 950 µL LB-Medium (10 g/L Trypton, 5 g/L Yeast, 10 g/L NaCl, 0.4 mL 10 M NaOH) hinzugegeben und 1 h bei 37 °C und 500 rpm inkubiert. 100 µL der Zellsuspension wurden auf einer mit 100 mg/L Ampicillin behandelten LB-Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert.

### 3.3.2 Ansetzen von Übertag- und Übernachtskulturen

Für die Übertag- und Übernachtskulturen wurde ein ÜT-Medium aus 12.5 mL 20% Glucose-Lösung, 250 µL Ampicillin und 237.25 mL LB-Medium angesetzt. Für die Übertagkulturen wurden frühmorgens 4 x 6 mL dieser Lösung in je 4 autoklavierte Kulturröhrchen gegeben. In diese wurde je eine Pipettenspitze gegeben, mit der zuvor ein Klon von einer am Abend davor angesetzten LB-Agar-Platte gepickt wurde. Die Kulturröhrchen wurden den Tag über bei 37 °C und 225 rpm inkubiert, wobei jede Stunde die optische Dichte bei 595 nm (OD<sub>595</sub>) gemessen wurde, bis diese um den Wert 0.6 bis 0.8 lag.

Für die Übernachtskulturen wurden in jeweils vier 250 ml-Erlenmeyerkolben 50 mL des ÜT-Mediums gegeben. Zu der Lösungen wurden jeweils 250 µL der Übertagkulturen gegeben und damit angeimpft. Die Erlenmeyerkolben wurden über Nacht bei 37 °C und 225 rpm inkubiert.



### 3.3.3 Präparative Expression

Die präparative Expression erfolgte in Form von *inclusion bodies* (IBs), aus denen im späteren Verlauf das Protein isoliert und in die native Form zurückgefaltet werden musste.

Morgens wurden die 5 L Schikane-Kolben mit jeweils 2 L LB-Medium versetzt und mit Ampicillin-Stocklösung ( $c_{\text{end}} = 100 \mu\text{g/mL}$ ) und 20% Glucose-Lösung ( $c_{\text{end}} = 1\%$  (w/v)) versetzt. Diese Lösungen wurden mit jeweils 40 mL der Übernackkulturen des Vorabends angeimpft und bei 37 °C und 125 rpm inkubiert. Jede Stunde wurden Proben zur Bestimmung der OD<sub>595</sub> und für analytische SDS-PAGE entnommen. Sobald die OD<sub>595</sub> bei 0.6 – 0.8 lag, wurde mit einer IPTG-Stocklösung ( $c_{\text{end}} = 1 \text{ mM}$ ) induziert. Die Kolben wurden weitere 4 h bei 37 °C und 125 rpm induziert, wobei jede Stunde Proben für die SDS-Page entnommen wurden.

Nachdem das Gen über 4 h exprimiert wurde, konnten die Zellen geerntet werden. Hierzu wurden die Kolben auf Eis gelagert bis die Nährlösung durch Zentrifugieren bei 7500 rpm und 4 °C für 15 min von den Zellen abgetrennt werden konnte. Die Zellpellets wurden in einem Puffer aus 25 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6 mM Urea und 1 mM TCEP bei pH 8.0 resuspendiert und konnten bei -80 °C gelagert werden.

### 3.3.4 Präparativer Zellaufschluss

Der Zellaufschluss im präparativen Maßstab wurde mit einem Druckluft betriebenen Fluidizer (*High Pressure Homogenizer*) der Firma *Avestin* durchgeführt. Bei Dieser Art von Zellaufschluss wird die Zellsuspension bei frei einstellbaren Drücken zwischen 30 und 2000 bar<sup>[106]</sup> stark komprimiert. Nach dem Durchtritt durch ein Ventil fällt der Druck rapide ab, wodurch es zu einer Expansion der Zellen kommt, die dadurch bersten und die Zellmembran zerstört wird.

Das Gerät wurde mit Eiswasser und eisgekühltem AM-Puffer (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8.0 20 mM, NaCl 200 mM) vorgekühlt und die Zellsuspension zwei Mal homogenisiert, damit eine vollständige Lyse der Zellen gewährleistet wurde. Falls das Gerät ins Stocken kam, wurde AM-Puffer hinzugegeben, um die Suspension zu verdünnen. Nach der Lyse der Zellen wurden sämtliche Proteasen mittels 0.1 mM EDTA und 0.2 mM PMSF-Lösung inhibiert und die lysierten Zellen auf Eis gestellt.

Die erhaltene Suspension wurde bei 4 °C und 15000 rpm für 30 min zentrifugiert um die IBs und Zelltrümmer von löslichen Bestandteilen zu trennen.

---

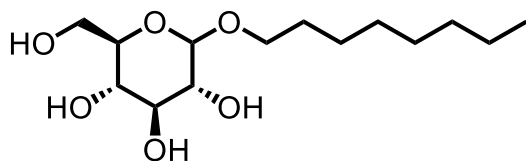
### 3.3.5 Aufreinigung der *inclusion bodies*

Vor der Rückfaltung in die native Konformation mussten die IBs noch von anderen, unlöslichen Bestandteilen wie Lipiden und anderen Membranproteinen befreit werden. Dies wurde durch mehrere Waschvorgänge mit detergenzhaltigem Puffer bewerkstelligt.

Hierzu wurde das Pellet in 20 mL eines RS-Puffers (50 mM Phosphatpuffer, pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 2.5% (v/v) Triton-X-100 und 1 mM TCEP) aufgenommen und mit einem Potter Homogenisator resuspendiert. Die Suspension wurde bei 4 °C und 15000 rpm für 15 min zentrifugiert und die beiden Schritte nochmals wiederholt.

### 3.3.6 Rückfaltung des Proteins und Protolyse mit Proteinase K

Für die Rückfaltung des Proteins wurde auf eine Vorschrift von W. Grosse zurückgegriffen.<sup>[107]</sup> Die Methode basiert auf einer schnellen Verdünnung (*rapid dilution*).



**Schema 46:** Rückfaltungsreagenz *n*-Octyl-glycopyranosid **118**.

Die benötigte Menge an IBs, um eine Endkonzentration von 1 g/L zu erhalten, wurde in ein Eppendorf-Cup überführt. Durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 3 min wurden die unlöslichen Membranproteine pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in

einem Puffer aus 25 mM Phosphatpuffer, 6 M Urea und 1 mM TCEP bei pH 8.0 aufgenommen. Durch Vortexieren und Erhitzen für 10 min a **118** bei 800 rpm wurde das Pellet gelöst und anschließend wurde erneut bei 13000 rpm für 3 min zentrifugiert, um den Rest an nicht gelöstem Bestandteilen abzutrennen. Der Überstand wurde in ein weiteres Eppendorf-Cup überführt und mit einem Puffer aus 25 mM Phosphatpuffer, 1 mM TCEP und 3% w/v OG (**118**) bei pH 8.0 auf 1 mg/mL OmpG verdünnt. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C und 450 rpm über Nacht.

Mittels SDS-PAGE wurde die Rückfaltung kontrolliert und mit Proteinase K die Probe verdaut.

Im rückgefalteten, nativem Zustand ist OmpG aufgrund seiner  $\beta$ -Fasstruktur nur sehr schwer oder gar nicht von Proteasen angreifbar.<sup>[23, 24]</sup> Dies wird dazu genutzt andere Membranproteine oder fehlerhaftes bzw. gar nicht zurückgefaltetes OmpG abzutrennen.

Hierzu wurde der Verdau für 30 min bei 25 °C, einer Endkonzentration von 10  $\mu$ g/mL Proteinase K (0.74 nM) und 1 mg/mL (0.3 mM) OmpG durchgeführt. Die Proteinase wurde

mit 13 nM PMSF inhibiert, auf Eis gelegt und über eine DEAE-Anionenaustauscher-Säule gereinigt. Die Reinigung wurde von *G. Psakis* nach einem Protokoll von *W. Große* durchgeführt.<sup>[73]</sup> Das Protein wurde säulenchromatographisch an einer Äkta Prime P100 (*GE Healthcare Europe GmbH*, München) in einem Puffer aus 10 mM Phosphatpuffer, pH 8.0, 50 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, 0.4% (v/v) C<sub>8</sub>E<sub>4</sub> über einen linearen Gradienten bis 500 mM aufgereinigt und anschließend gegen einen pH 8.0 Puffer aus 2 mM Phosphatpuffer, 1 M NaCl, 10% v/v Glycerin und 0.4% (v/v) C<sub>8</sub>E<sub>4</sub> dialysiert.

#### **3.3.7 Aufkonzentration des Proteins**

Das Aufkonzentrieren erfolgte bei 4 °C und 4000 rpm in Amicon ultra-Konzentratoren (*Millipore*) mit einem *molecular-weight-cut-off* von 10 kDa und einem Fassungsvermögen von 5 mL. Alle 5 min wurde das Zentrifugieren unterbrochen und die Lösung mittels einer Pipette durchmischt, um einen Konzentrationsgradienten zur Membran zu verhindern. Somit wurde das Protein am Ausfallen gehindert. Der Vorgang wurde so lange durchgeführt bis eine geeignete Konzentration bzw. das gewünschte Endvolumen erreicht wurde.<sup>[22]</sup>

---

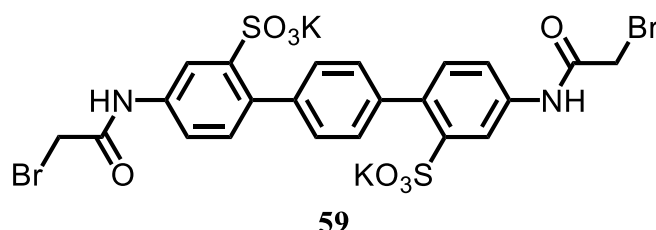
## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Ergebnisse bei OmpG

Bei allen Biohybriden der Mutante OmpG/ $\Delta$ l6/C13/C154 sollte über tryptischen Verdau und anschließender Massenspektrometrie eine Quervernetzung nachgewiesen werden. Die Detektion von crossgelinkten Strukturen gelang bisher allerdings bei keinem Protein. Hingegen konnten monogelinkte Verbindungen des 154Cys-Fragments gefunden werden. Da nach der Funktionalisierung zwar das unsubstituierte  $^{13}$ Cys-Fragment NIGACY detektiert werden konnte, aber es nicht gelang ein funktionalisierte Fragment zu detektieren, ist dies weder ein Beleg für noch gegen eine geglückte Zwei-Punkt-Anknüpfung. Alle weiteren analytischen Verfahren und Ergebnisse der Reaktionen mit OmpG sind in den entsprechenden Kapiteln behandelt.

#### 4.1.1 Reaktionen mit Terphenyl 59

Der Umsatz der Terphenyle **53** und **54** mit der Mutante OmpG/ $\Delta$ l6/C13/C154 wurde von *G. Psakis* durchgeführt. Wie in Kapitel 3.1.1 erwähnt, führten diese Umsetzungen nicht zum erwünschten Erfolg. Es wurde nur Denaturierung beobachtet, da die Moleküle für die chemische Modifizierung in zu viel organischem Lösungsmittel gelöst werden musste.

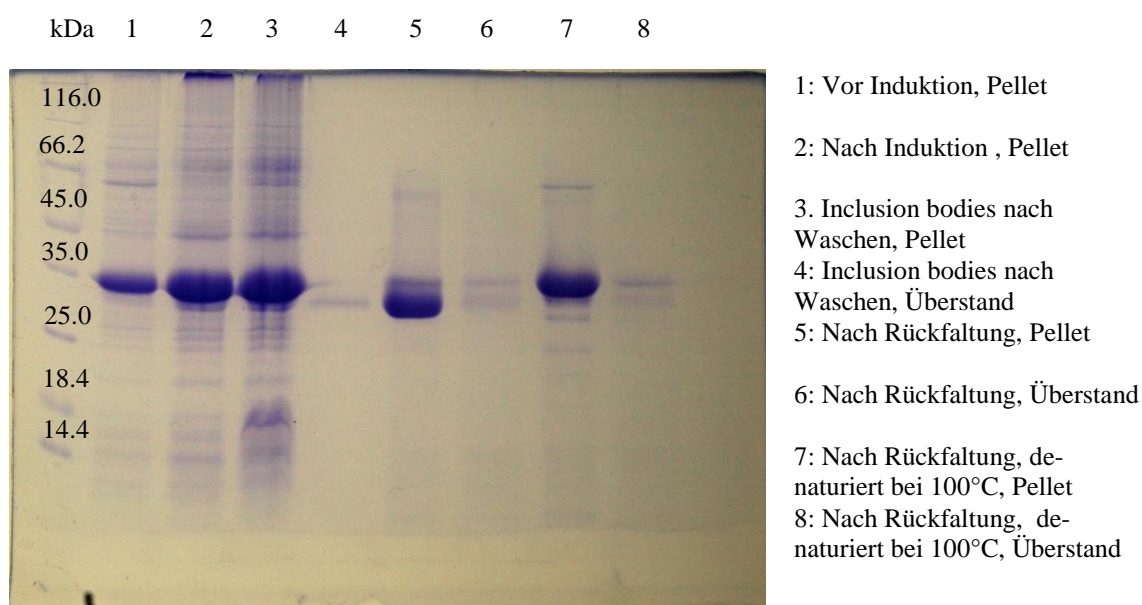


**Schema 47:** Struktur des Modulators **59**.

Alle Reaktionen von **59** mit OmpG/ $\Delta$ l6/C13/C154 wurden von mir unter Aufsicht von *G. Psakis* durchgeführt, wobei die Äffinitätschromatographien und Kristallisationsansätze von *G. Psakis* ausgeführt wurden. Für die durchgeführten Umsetzungen mit dem Sulfonat **59** wurde die Mutante OmpG/ $\Delta$ l6/C13/C154 frisch von mir produziert und aufgereinigt. Hierbei handelt es sich um eine OmpG-Mutante mit zwei Cysteinen und deletierten L6-loop. Der deletierte

*loop* sorgt für ein ruhigeres Verhalten des Porins in BLM-Messungen. Die Methode zur Expression dieser Mutante findet sich in Kapitel 3.3. Für die Proben der SDS-PAGE wurde das jeweilige Pellet von 1 mL Zellsuspension in 50  $\mu$ L SDS-Probenpuffer aufgenommen. Von jeder vorbereiteten Probenlösung wurden 5  $\mu$ L auf das Gel aufgetragen, sowie 5  $\mu$ L des Überstands des Pellets nach der Induktion.

Abb. 4.1 zeigt das SDS-PAGE-Gel der Herstellung der *inclusion bodies* der OmpG/ $\Delta$ l6/C13/C154-Mutante (Bahnen 1 bzw. 2), deren Waschvorgänge (Bahnen 3 bzw. 4) und die Rückfaltung. Die Bahn 7 zeigt OmpG in seiner denaturierten Form und Bahn 5 in der Zurückgefalteten.



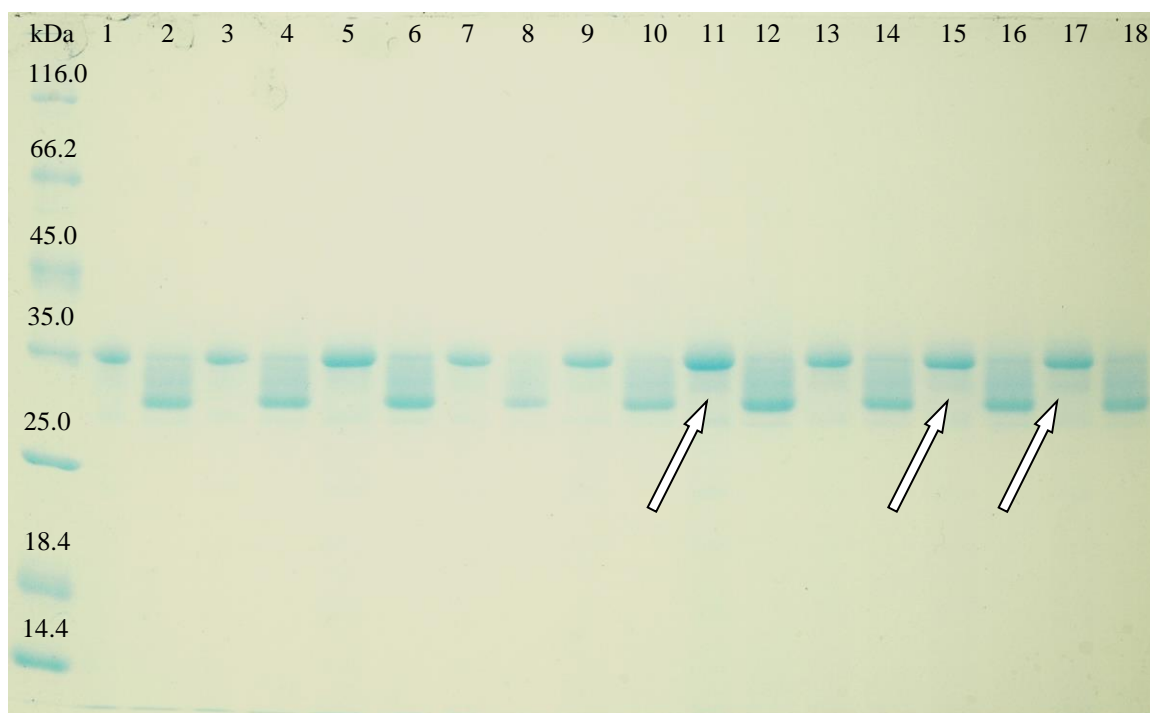
**Abb. 4.1:** Gel der SDS-PAGE der Expression der OmpG-Doppelmutante OmpG/ $\Delta$ l6/C13/C154. Coomassie gefärbt.

Umsetzungen von OmpG/ $\Delta$ l6/C13/C154 mit dem Sulfonate **59** erfolgten in einem pH 8.0 Puffer aus 2 mM Phosphatpuffer, 1 mM NaCl, 10% v/v Glycerin und 0.4% C<sub>8</sub>E<sub>4</sub> mit 1% v/v TCEP (0.1 M in H<sub>2</sub>O) und einer Endkonzentration des Porins von 0.05 mM. Alle Reaktionen erfolgten bei 25 °C und unter Lichtausschluss. Es wurde für die Zugabe des Terphenyls eine Stammlösung in bidestilliertem Wasser von 0.05 M angesetzt.

Es wurden drei Reaktionslösungen vorbereitet mit 250  $\mu$ L Endvolumen. Zu allen wurden 0.25  $\mu$ L (0.5 eq) der Sulfonat-Stammlösung geben. Nach zwei Stunden wurden von allen Ansätzen 20  $\mu$ L Lösung entnommen und zu zwei der Proben jeweils 0.23  $\mu$ L (0.5 eq) der Sulfonat-Stammlösung gegeben. Nach insgesamt 4 h wurden erneut von allen Reaktionen 20  $\mu$ L Proben entnommen und in die dritte Reaktionslösung 0.21  $\mu$ L (0.5 eq, Endäquivalente

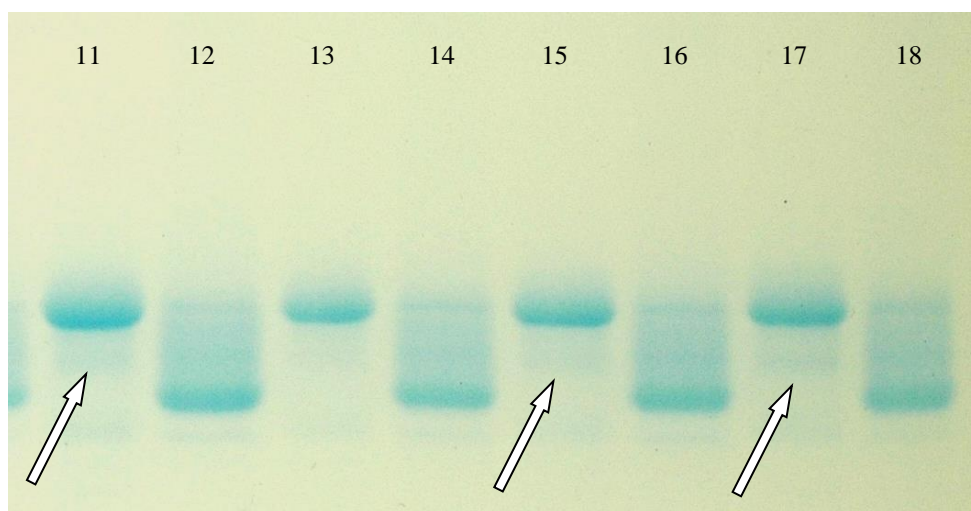
1.5 eq) der Stammlösung gegeben. Nach insgesamt 6 h wurden erneut 20  $\mu$ L abgenommen und die Reaktionen über Nacht (insgesamt 22 h) gerührt.

Von den neun Proben wurden je zweimal 0.75  $\mu$ L abgenommen und mit 2  $\mu$ L SDS-Puffer und 2  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O versetzt. Eine der abgenommenen Proben wurde für 10 min bei 95 °C erhitzt und alle Proben auf eine SDS-PAGE aufgetragen. Das Gel der SDS-PAGE ist in Abb. 4.2 zu sehen.



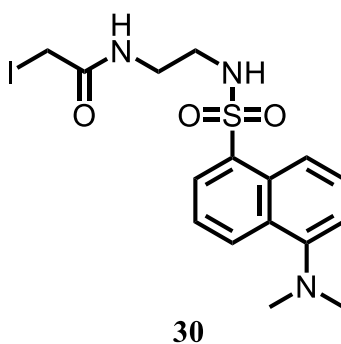
**Abb. 4.2:** Gel der SDS-PAGE der zeitabhängigen Zugabe von **59** zu OmpG/ $\Delta$ l6/C13/C154. Variiert wurden die Terphenyl-End-Äquivalente und die Reaktionszeit. **1)** 0.5 eq, 2 h, erhitzt; **2)** 0.5 eq, 2 h, nativ; **3)** 0.5 eq, 4 h, erhitzt; **4)** 0.5 eq, 4 h, nativ; **5)** 0.5 eq, 6 h, erhitzt; **6)** 0.5 eq, 6 h, nativ; **7)** 1.0 eq, 2 h, erhitzt; **8)** 1.0 eq, 2 h, nativ; **9)** 1.0 eq, 4 h, erhitzt; **10)** 1.0 eq, 4 h, nativ; **11)** 1.0 eq, 6 h, erhitzt; **12)** 1.0 eq, 6 h, nativ; **13)** 1.5 eq, 2 h, erhitzt; **14)** 1.5 eq, 2 h, nativ; **15)** 1.5 eq, 4 h, erhitzt; **16)** 1.5 eq, 4 h, nativ; **17)** 1.5 eq, 6 h, erhitzt; **18)** 1.5 eq, 6 h, nativ.

Es ist zu erkennen, dass bei erhöhter Konzentration und längerer Reaktionsdauer eine zweite, schwache Bande entstanden ist (Eintrag 11, 15 und 17, durch Pfeile markiert) und dass so gut wie keine Denaturierung stattfindet. Dies kann ein Hinweis auf eine chemische Modifizierung der Pore, wie beispielsweise auf eine Querverknüpfung oder einfache sowie doppelte Monoverknüpfung. Weiterhin kann dies aber auch auf eine nicht vollständige Entfaltung des Proteins auf Grund von Aggregation oder unspezifischer Bindungen hindeuten. Die Vergrößerung der SDS-PAGE ist in Abb. 4.3 zu sehen.



**Abb. 4.3:** Vergrößerung der Einträge 11 bis 18 aus Abb. 4.2. In Einträgen 11, 15 und 17 ist eine neue Bande zu sehen.

Nach 22 h Reaktionszeit wurde überprüft, ob der Umsatz der Cysteine bei den unterschiedlichen Äquivalenten vollständig war. Hierzu wurde das Dansyliodacetamid **30** verwendet, dessen Synthese von *M. Cebi* entwickelt wurde.<sup>[73]</sup> Die Struktur ist in Schema 44 zu sehen.



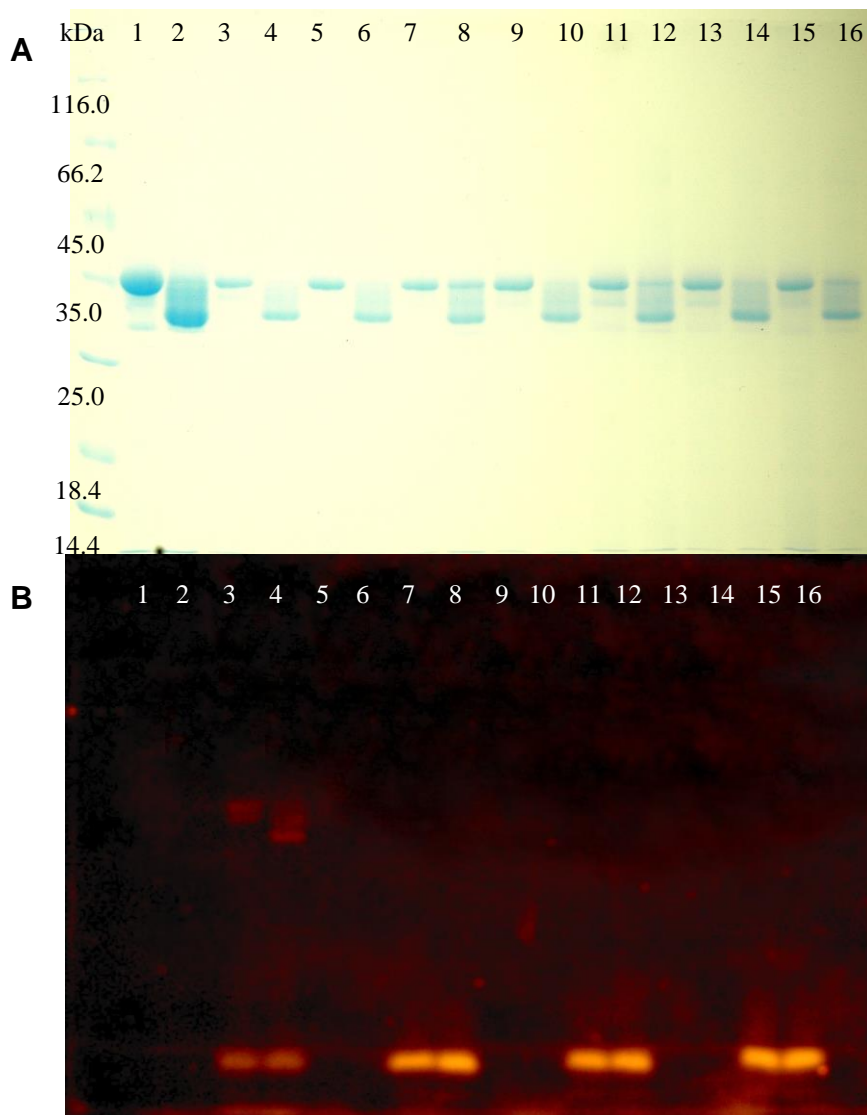
**Schema 48:** Struktur des Dansyliodacetamids **30**.

**30** ist eine UV-fluoreszierende Verbindung, die als UV-Marker verwendet wird. Über eine  $S_N$ -Reaktion können Thiole von Cysteinen das Iod substituieren und kovalent an **30** binden. Bei Bestrahlung mit UV-Licht leuchten anschließend nur Proben, die Verbindung **30** kovalent gebunden haben.

Von den drei Reaktionslösungen wurden jeweils 20  $\mu$ L entnommen und wie zuvor für die SDS-PAGE vorbereitet, sodass eine native und eine denaturierte Probe erhalten wurde. Weitere 20  $\mu$ L von jeder Probe wurden mit 0.2  $\mu$ L TCEP (0.1 M in  $H_2O$ ) und 0.4  $\mu$ L einer

0.05 M Lösung von **30** in DMSO versetzt und für 2 h bei 275 rpm geschüttelt. Diese Lösungen wurden entsprechend der anderen Proben vorbereitet. Als Referenz wurde eine Lösung von OmpG und eine Probe von OmpG, die mit 0.4  $\mu$ L der **30**-Lösung versetzt, wurde, benutzt. Beide Referenzen wurden mit 0.2  $\mu$ L 0.1 M TCEP versetzt.

Abb. 4.4 zeigt die SDS-PAGE der Dansyl-Markierung. Nach 22 h sind weitere Banden im denaturierten Zustand bei erhöhten Äquivalenten zu erkennen (Spalte 9, 11, 13 und 15). Zugabe von Dansyl **30** führt teilweise zu Denaturierung (Spalte 8, 12 und 16), was wohl auf das enthaltene Lösungsmittel DMSO zurückzuführen ist.



**Abb. 4.4:** Gel der SDS-PAGE der 22 h-Reaktion von OmpG/ $\Delta$ l6/C13/C154 mit **59**. Es wurde mit Dansyl **30** auf freie Cysteine überprüft. **A)** Coomassie angefärbt, **B)** Unter UV-Licht. 1) OmpG erhitzt; 2) OmpG nativ; 3) OmpG + **30**, erhitzt; 4) OmpG + **30**, nativ; 5) 0.5 eq **59**, erhitzt; 6) 0.5 eq **59**, nativ; 7) 0.5 eq **59** + **30**, erhitzt; 8) 0.5 eq **59** + **30**, nativ; 9) 1.0 eq **59**, erhitzt; 10) 1.0 eq **59**, nativ; 11) 1.0 eq **59** + **30**, erhitzt; 12) 1.0 eq **59** + **30**, nativ; 13) 1.5 eq **59**, erhitzt; 14) 1.5 eq **59**, nativ; 15) 1.5 eq **59** + **30**, erhitzt; 16) 1.5 eq **59** + **30**, nativ.

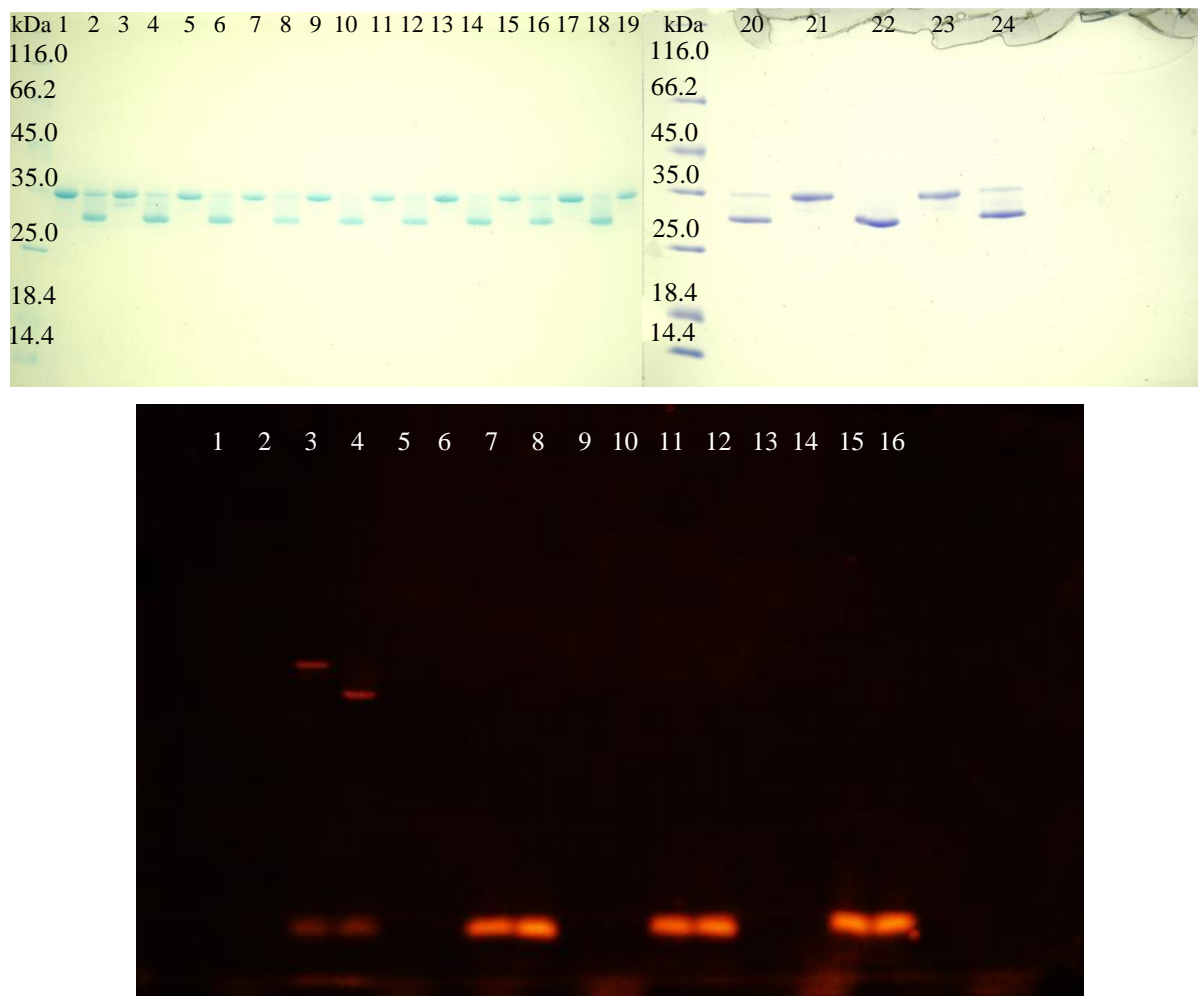


Unter UV-Licht sind nur bei den OmpG-Blindproben Fluoreszenz zu erkennen. Selbst bei 0.5 Äquivalenten an **59** war keine spezifische Bindung des Dansyls **30** zu beobachten (Abb. 4.5). Da selbst bei einer Reaktion mit Unterschuss von **59** keine Reaktion des Dansyls **30** mit den Cysteinen stattfand, deutet das darauf hin, dass eventuell die Pore anderweitig blockiert wird. Ob dies an einer unspezifischen Bindung von **59** an OmpG liegt oder einer anderen Ursache konnte nicht geklärt werden.

Da bei kurzen Reaktionszeiten und 1.0 eq **59** eine zwar schwache, aber neue Bande beobachtet wurde (vergleiche Abb. 4.2, Spalte 11), wurde eine Zeitmessung unter diesen Bedingungen durchgeführt. Im Vergleich zum Umsatz mit 0.5 eq. **59** kann es hierbei zu quantitativen Umsatz der Cysteine kommen und die Chance einer doppelten Ein-Punkt-Anknüpfung sollte hierbei auch geringer sein als bei den Versuchen mit 1.5 eq. **59**.

Es wurden zwei Lösungen zu je 250 µL derselben Zusammensetzung wie bei dem Äquivalentenversuch angesetzt. Die erste Lösung war die Blindprobe von der 20 µL entnommen und mit 0.4 µL 0.05 M **30** in DMSO versetzt wurden. Zu der zweiten Lösung wurden 0.5 µL 0.05 m Sulfonat **59** in Wasser gegeben und jede Stunde über 5 h hinweg zweimal 10 µL entnommen. Zu jeweils einer dieser 10 µL Proben wurde 0.4 µL 0.05 M **30** in DMSO gegeben und mindestens 1 h rühren gelassen. Alle zwölf Proben wurden identisch zu den vorigen Proben für die SDS-PAGE vorbereitet.

Abb. 4.6 und Abb. 4.7 zeigt das SDS-PAGE-Gel mit Coomassie angefärbt bzw. unter UV-Licht. Es ist zu erkennen, dass es keine neue Bande gibt wie bei den Umsetzungen zuvor (Abb. 4.2 und Abb. 4.4). Weiterhin ist im UV nur bei der Blindprobe eine UV-aktive Bande zu finden. Schon nach 1 h Reaktionszeit ist keine spezifische Bindung zu sehen. Zur Überprüfung, ob der Umsatz zu dem Zeitpunkt quantitativ war oder ob dies auf unspezifische Bindungen des Terphenyls zurückzuführen war, hätten Messungen in noch kleineren Zeitintervallen gemacht werden müssen.



**Abb. 4.6:** SDS-PAGE der Zeitmessung von OmpG/ΔI6/C13/C154. Oben: Coomassie gefärbt, Unten: Unter UV-Licht. 1) OmpG, erhitzt; 2) OmpG, nativ; 3) OmpG + 30, erhitzt; 4) OmpG + 30, nativ; 5) OmpG + 59, 1 h, erhitzt; 6) OmpG + 59, 1 h, nativ; 7) OmpG + 59, 30, 1 h, erhitzt; 8) OmpG + 59, 30, 1 h, nativ; 9) OmpG + 59, 2 h, erhitzt; 10) OmpG + 59, 2 h, nativ; 11) OmpG + 59, 30, 2 h, erhitzt; 12) OmpG + 59, 30, 2 h, nativ; 13) OmpG + 59, 3 h, erhitzt; 14) OmpG + 59, 3 h, nativ; 15) OmpG + 59, 30, 3 h, erhitzt; 16) OmpG + 59, 30, 3 h, nativ; 17) OmpG + 59, 4 h, erhitzt; 18) OmpG + 59, 4 h, nativ; 19) OmpG + 59, 30, 4 h, erhitzt; 20) OmpG + 59, 30, 4 h, nativ; 21) OmpG + 59, 5 h, erhitzt; 22) OmpG + 59, 5 h, nativ; 23) OmpG + 59, 30, 5 h, erhitzt; 24) OmpG + 59, 30, 5 h, nativ.

Die Reinigung der chemisch modifizierten Mutanten erfolgte mittels Biotin-Tag<sup>[108]</sup> brachte keine Ergebnisse. Es wurden von *G. Psakis* Kristallisationsansätze vorbereitet. Unmodifizierte OmpG-Mutanten bilden meistens innerhalb von 3-5 Tagen messbare Kristalle.<sup>[22]</sup> Dieses Biohybrid führte allerdings zu sehr langsamen Kristallwachstum (>25 Tage). Da die Modifikation des Proteins auf der Innenseite der Pore stattgefunden hat, wäre von einer ähnlich schnellen Kristallisation wie vom Wildtyp auszugehen. Das langsame Wachstum könnte ein Indiz für eine unspezifische Bindung von 59 auf der Proteinaußenseite sein, so dass bestehende Kristallkontakte im Wildtyp getrennt wurden. Die Kristallqualität

war zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch ungenügend um vermessen werden zu können und den Verdacht zu bestätigen.

Abb. 4.8 zeigt einen Kristallisationsansatz nach zwei Monaten (Bedingungen 50 mM NaCacodylat, 32% PEG 400, 800 mM NaFormiat, pH 5.5). In der Markierung sind Kristallplatten einer Größe von ungefähr 50  $\mu\text{m}$  zu sehen.

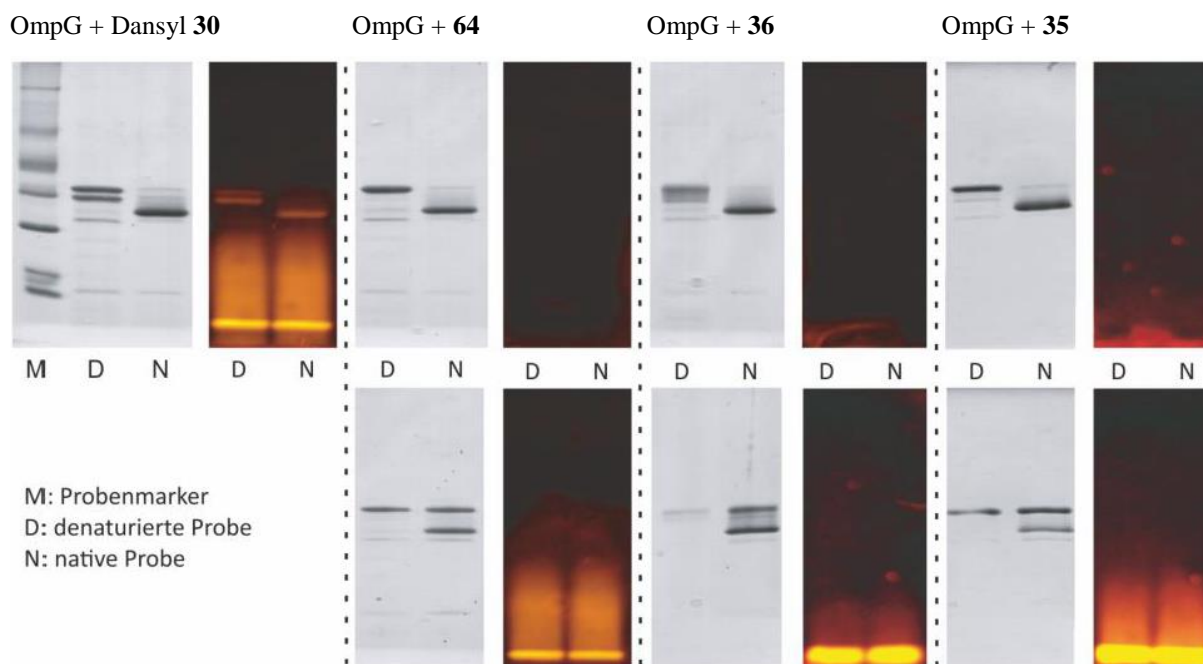


**Abb. 4.8:** Kristallisationsansatz von OmpG/ $\Delta$ l6/C13/C154 + **59**.

#### 4.1.2 Umsatz mit Iodacetamidkronen **35**, **36**, **37** und **64**.

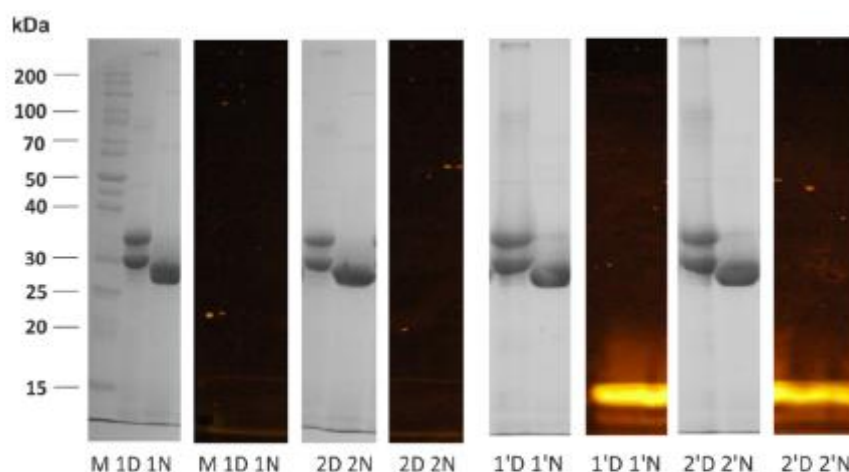
Die Reaktionen der Mutante OmpG/ $\Delta$ l6/C13/C154 mit den Kronenderivaten **35**, **36**, **37** und **64** wurden von A. Borowiak durchgeführt.<sup>[108]</sup>

Die SDS-PAGE der Reaktionen der kleinen Kronen **35**, **36** und **64** ist in Abb. 4.9 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass es keinen Laufunterschied zwischen den einzelnen Reaktionen mit den Kronenethern, weder im nativen noch denaturierten Zustand gibt. Im denaturierten Zustand zeigten sich Banden, die auf der Höhe des nativen beziehungsweise zwischen dem nativen und denaturierten Proteins liefen. Allerdings zeigten sich diese Banden auch bei der Umsetzung mit dem Monoiodacetamid **64**. Die Kontrollreaktion mit Danysl **30** zeigte bei allen Proben kompletten Umsatz der Cysteine. Zum einen der erfolgreiche Umsatz der Thiole und damit negativen UV-Kontrolle und zum anderen die nur schwach sichtbaren Banden im denaturierten Zustand sprechen gegen eine erfolgreiche Zwei-Punkt-Anknüpfung.



**Abb. 4.9:** SDS-PAGE der Reaktionen der Iodacetamide **35**, **36** und **64** mit OmpG/ $\Delta$ l6/C13/C154 (oben) und die Kontrollreaktion mit Dansyl **30** (unten).<sup>[108]</sup>

Das SDS-PAGE-Gel der Reaktion der großen Krone **37** mit OmpG/ $\Delta$ l6/C13/C154 ist in Abb. 4.10 gezeigt. Im denaturierten Zustand zeigte sich bei allen Reaktionen eine neue Bande, die zwischen dem komplett denaturierten und nativen Zustand lag. Dies spricht für eine unvollständige Entfaltung des Porins und kann ein Indiz für eine Zweipunktanknüpfung sein. Die Dansylkontrolle zeigte nur schwache Banden im UV, weshalb von einem nahezu vollständigen Umsatz der Cysteine ausgegangen werden konnte. Ob dieses Ergebnis aufgrund von Zwei-Punkt-Verknüpfung oder doppelter Ein-Punkt-Anknüpfung entstand konnte durch das SDS-PAGE-Gel nicht geklärt werden.



**Abb. 4.10:** SDS-PAGE von OmpG/ $\Delta$ l6/C13/C154 mit Kronenether **37**. Links sind zwei Reaktionen im nativen und denaturierten Zustand gezeigt, rechts dieselben Reaktionen mit Dansyl **30** als Reaktionskontrolle.<sup>[108]</sup>

Zum Beleg der vermeintlichen Zwei-Punkt-Anknüpfung sollte das Porin weiter gereinigt und über Röntgenkristallstrukturanalyse untersucht werden. Aufreinigungen über Biotinylierung und anschließender Affinitätschromatographie sowie Fractogel®-Ionenaustauschchromatographie brachte keine höhere Reinheit des modifizierten Proteins. Kristallisationsversuche des mit Verbindung **37** modifizierten Porins führte allerdings nach drei Tagen zu dreidimensionalem Kristallwachstum (Abb. 4.11, Kristallisationsbedingungen: 50 mM Cacodyl, 32% PEG 400, 800-1000 mM Formiat, pH 5.25-5.5). Allerdings waren die bisher aus den Kristallen erhaltenen Datensätze ungenügend und konnten somit nicht prozessiert werden, weshalb ein einwandfreier Nachweis der Querverknüpfung noch ausbleibt.



**Abb. 4.11:** Erfolgreiches Kristallwachstums von OmpG/ΔI6/C13/C154 + **37**. Der rote Kreis zeigt orthorhombische Porinkristalle. Weiterhin sind Artefakte zu sehen, welche aus Detergenzkristallen bestehen bzw. auf Grund von Phasenseparation entstanden sind.

#### 4.1.3 Zeitmessungen und Testreaktionen von **37** und **59**.

Aufgrund der negativen Aufreinigungsversuche mittels Biotin-Tag sollte die Stabilität gegenüber Hydrolyse des Terphenyls **59** bzw. der Krone **37** überprüft werden und die Verbindungen auf die Reaktion mit Cystein untersucht werden. **37** wurde hierzu in CD<sub>3</sub>CN gelöst und mit 15% D<sub>2</sub>O versetzt und über einen Zeitraum von zwei Tagen im NMR verfolgt. **59** wurde in D<sub>2</sub>O gelöst und über eine Tag im NMR verfolgt. Abb. 4.12 und Abb. 4.13 zeigen die Spektren. Beide Verbindungen waren hydrolysestabil bei Raumtemperatur und pH = 7.

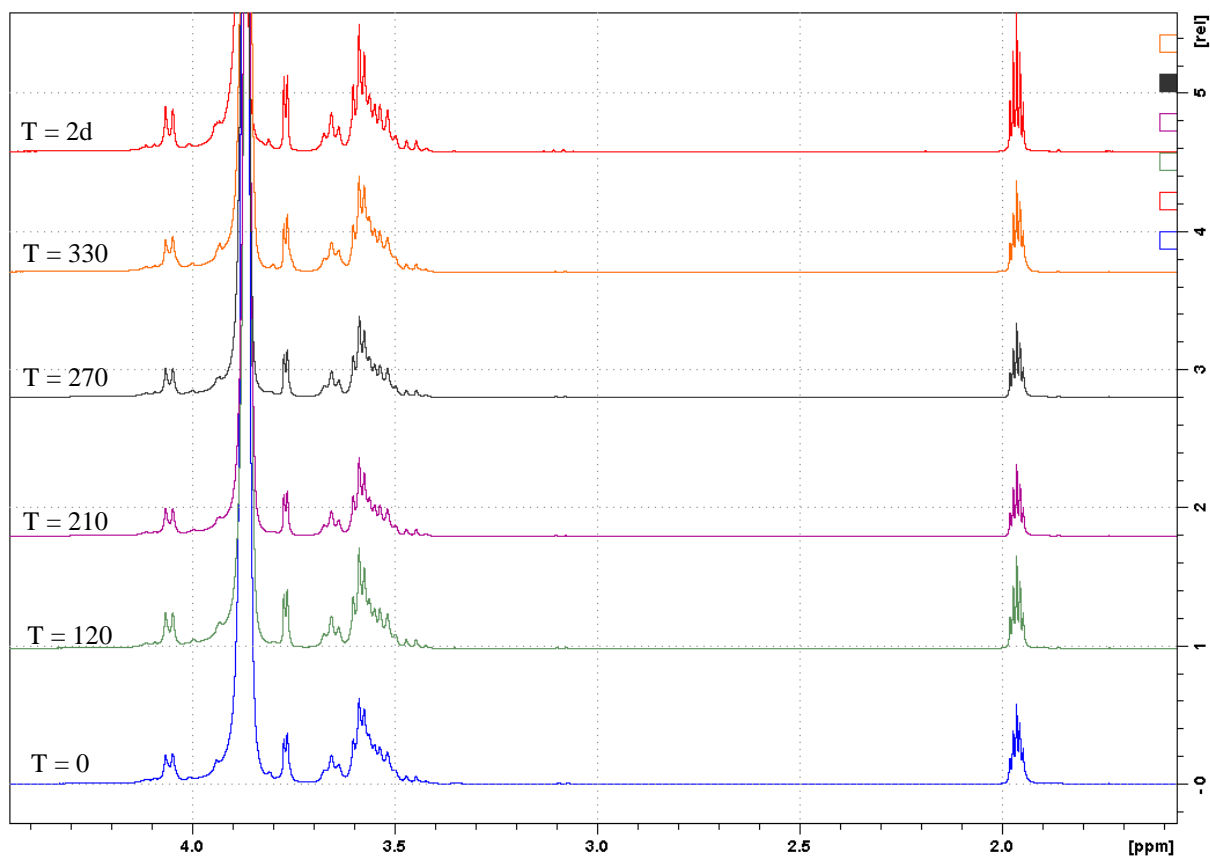


Abb. 4.12: Zeitmessung der Krone **37** in CD<sub>3</sub>CN und D<sub>2</sub>O. Zeit in Minuten.

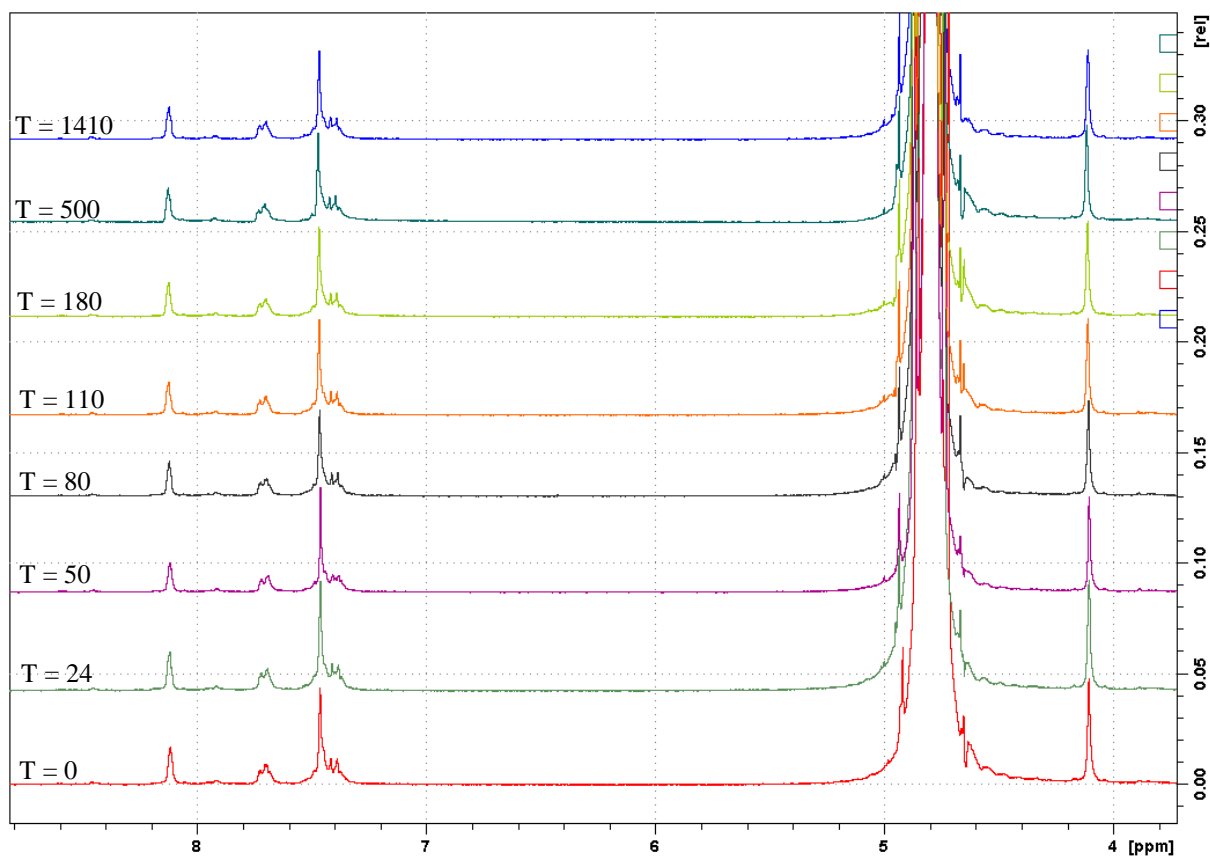
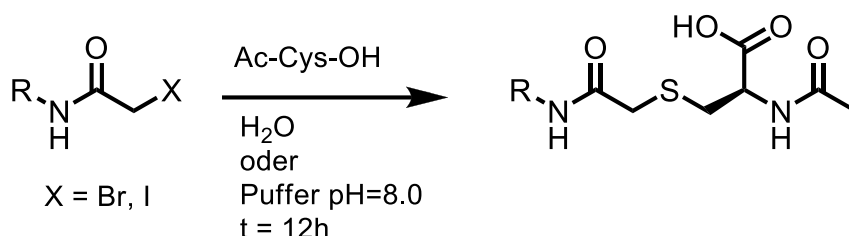


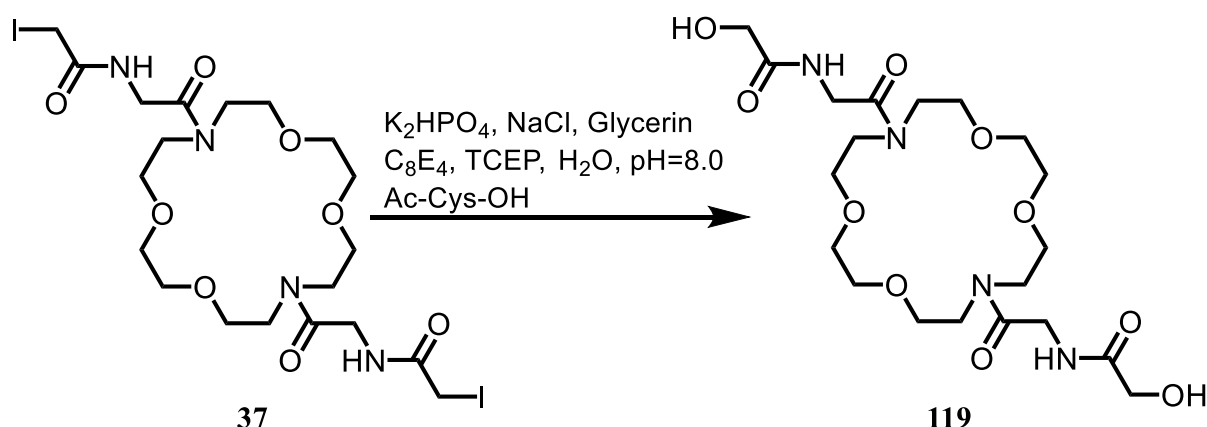
Abb. 4.13: Zeitmessung des Terphenyls **59** in D<sub>2</sub>O. Zeit in Minuten.

Die Testreaktionen der beiden Verbindungen **37** und **59** mit acetylgeschütztem Cystein wurden unter gleichen Bedingungen (Reaktionszeit 12 h, 25 °C) wie die Umsetzung des Proteins zum einen in H<sub>2</sub>O und zum anderen im Puffersystem der Proteinumsetzung (2 mM Phosphatpuffer, pH 8.0, 1 mM NaCl, 10% v/v Glycerin und 0.4% C<sub>8</sub>E<sub>4</sub> mit 1% v/v TCEP) durchgeführt (Schema 49).



**Schema 49:** Allgemeine Testreaktion von Ac-Cys-OH mit Haloacetamiden.

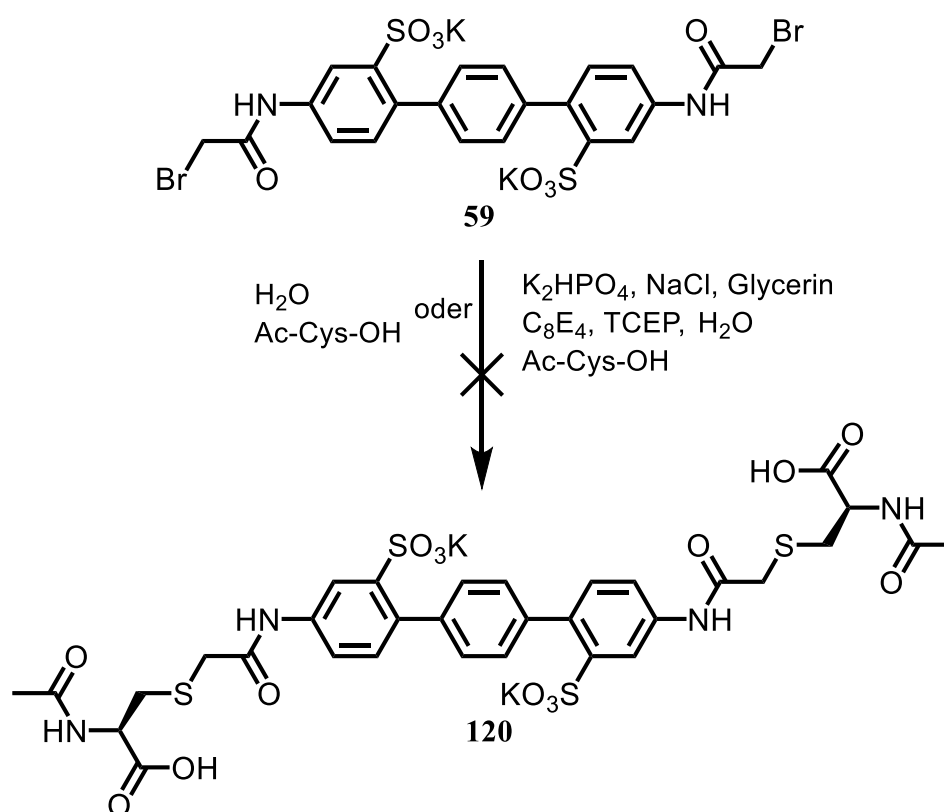
In der Massenspektrometrie wurden die entsprechenden Massenpeaks für die gewünschten Produkte zwar gefunden, allerdings schlug jeglicher Versuch diese Produkte säulenchromatographisch zu isolieren fehl, da der Umsatz zu gering war. Bei der Reaktion von **37** im Puffersystem konnte entgegen voriger Ergebnisse das Hydrolyseprodukt **119** erhalten werden (Schema 50). Dies lässt darauf schließen, dass der pH-Wert einen entscheidenden Einfluss auf die Hydrolyse hat und auch bei der Reaktion des Porins im entsprechenden Puffersystem die Haloacetamide hydrolysieren, weshalb bisherige Reinigungsmethoden der Biohybride fehlschlagen.



**Schema 50:** Testreaktion von **37** im Puffersystem.

Die Reaktion des Terphenyls **59** konnte auf Grund der Polarität der Verbindung weder über Flashkieselgel noch *reversed phase* Kieselgel aufgereinigt werden (Schema 51). Das Edukt **59**

und das Produkt **120** kamen in allen Laufmitteln auf der *reversed phase* HPLC mit dem Todvolumen, weshalb kein sauberes **120** erhalten werden konnte. Allerdings konnte auch kein Hydrolyseprodukt isoliert werden, da dieses auch zu polar für Flashkieselgel bzw. *reversed phase* Kieselgel ist. Für solche Problemstellungen würden sich HILIC-Säulen eignen<sup>[114, 115]</sup>, allerdings standen diese bei dieser Arbeit nicht zur Verfügung.



**Schema 51:** Reaktion von **59** mit Cystein unter Pufferbedingungen und in Wasser.

Aufgrund der fehlgeschlagenen Aufreinigung der Testreaktion von **59** konnte keine klare Aussage über die Reaktivität von **59** gemacht werden. Es kann allerdings davon ausgegangen werden, dass es, ähnlich wie bei **37**, zu einer Hydrolyse der Bromide beim Umsatz im Proteinpuffer kommt. Weiterhin ist aber beim Umsatz von **37** mit OmpG/ $\Delta$ l6/C13/C154 eine klare, neue Bande zu erkennen gewesen, welche für eine Zwei-Punkt-Anknüpfung sprechen könnte. Ähnliche, aber viel schwächere Indizien zeigten sich bei den Umsätzen mit **59** ebenfalls, was ebenfalls für eine Querverknüpfung sprechen könnte.

Diese unterschiedlichen Beobachtungen können zum einen durch die unterschiedliche chemische Umgebung der Cysteine erklärt werden. Bei manchen Proteinen wurde zuvor beobachtet, dass Reaktionen durch die Tertiärstruktur der Peptide beschleunigt werden können verglichen zu Testsystemen aus wenigen Aminosäuren.<sup>[116]</sup> Dies könnte auch hier der



Fall sein. Das heißt, sobald ein Iodacetamid in die Pore diffundiert ist, ist eine Substitution der Cysteine einer Hydrolyse der Halogenide bevorzugt.

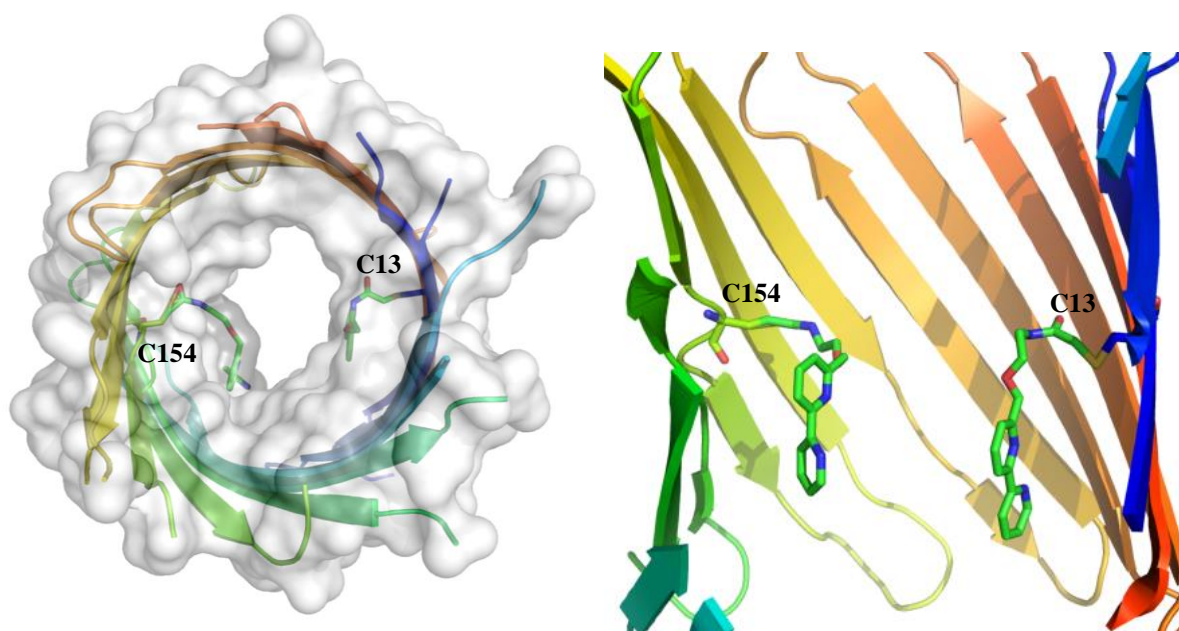
Weiterhin wäre es denkbar, dass die neuen Banden in den SDS-PAGE-Gelen aufgrund von *false positiv* Ergebnissen entstanden sind. Zum Beispiel könnten die neuen Banden auch entstehen, wenn die nicht kovalent gebundenen Linker für eine unvollständige Entfaltungen unter den denaturierenden Gel-Bedingungen sorgen und stabile Überstrukturen bilden. Die Ergebnisse der Reaktion von OmpG/ $\Delta$ l6/C13/C154 mit 0.5 eq. des Terphenyls **59** könnten für die Bildung solcher Überstrukturen sprechen. Proben, die mit dem Dansyl-Marker **30** auf unreagierte Cysteine überprüft wurden, zeigten keine UV-Aktivität in den SDS-PAGE-Gelen. Dies bedeutet, dass bei 0.5 eq. **59** alle Cysteine reagiert haben müssten, was bei Unterschuss des Reagenz nicht möglich sein kann. Folglich muss dieses Ergebnis *false positiv* sein und kann damit ein Indiz für Überstrukturen sein.

Eine Klärung dieser Fragestellungen hätte mit Kristallstrukturen gelöst werden können, aber weder von den Biohybriden mit **59** oder **37** gelang es bisher eine prozessierbare Kristallstruktur zu erhalten.

#### 4.1.4 Umsatz der Bipyridine **38** und **80** mit OmpG

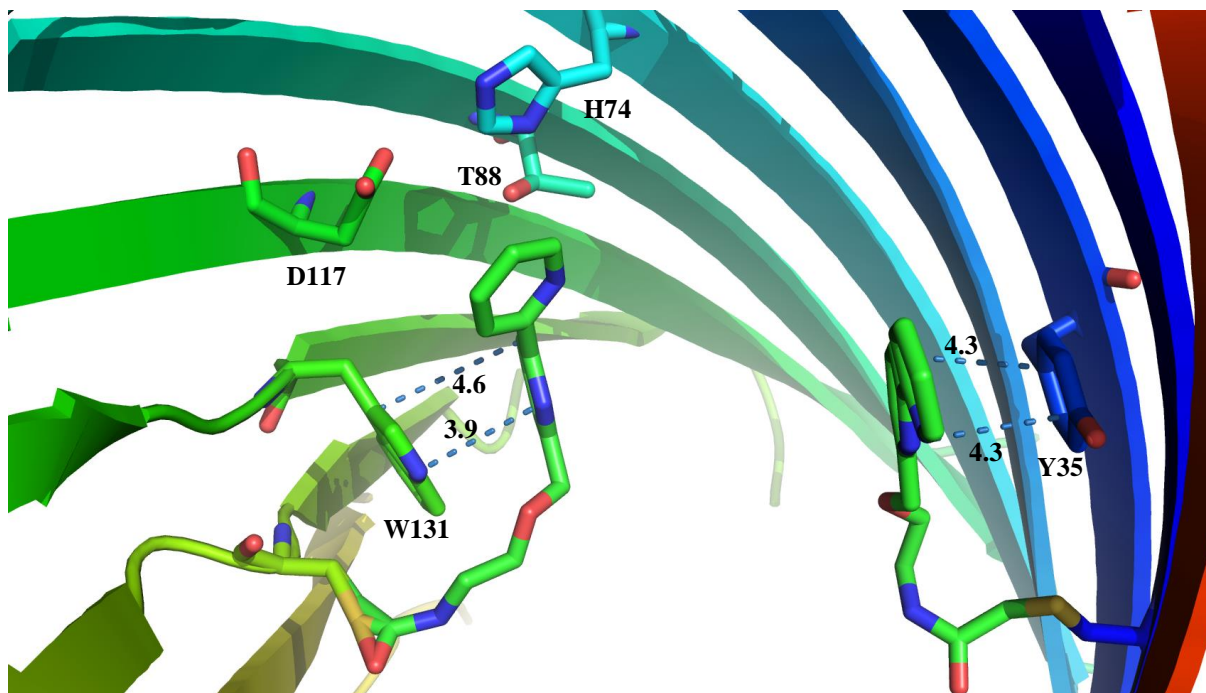
Die Reaktionen von OmpG/ $\Delta$ l6/C13/C154 mit den Bipyridinen **38** und **80** wurden von W. Grosse bei **80** und G. Psakis bei **38** durchgeführt.

Von den beiden Bipyridinen zeigte nur **80** einen erfolgreichen Umsatz nach tryptischem Verdau und anschließender massenspektrometrischer Analyse.<sup>[22]</sup> Zur röntgenkristallografischen Untersuchung benötigte Kristalle wurden von G. Psakis erhalten und an der *European synchrotron radiation facility* in Grenoble, Frankreich, vermessen. Die erhaltenen Strukturdaten bestätigten die vermutete Struktur einer doppelten Ein-Punkt-Anknüpfung des Bipyridins **80** innerhalb von OmpG. Abb. 4.14 zeigt die aus den bis dato prozessierten Daten erhaltene Struktur dieses Biohybrids (OmpG/ $\Delta$ l6/C13/C154+BiPy). Die Auflösung dieser Struktur beträgt 3.2 Å bei einer orthorhombischen Raumgruppe (C2). Zum Zeitpunkt dieser Arbeit war die finale Verfeinerung noch nicht beendet.



**Abb. 4.14:** Kristallstruktur von OmpG/ $\Delta$ I6/C13/C154 mit Bipyridin **80**. **A)** Aufsicht von der dem Periplasma zugewandten Seite mit dargestellter Oberfläche. **B)** Seitenansicht.

Abb. 4.15 zeigt eine Vergrößerung der Bipyridin-Linker und die Abstände zu den koordinierenden Aminosäuren W131 und Y35. Tryptophan W131 koordiniert über ein  $\pi$ -*stacking* mit einem mittleren Abstand von 4.3 Å das verdrehte Bipyridin. Die Verdrillung rührt vom sterischen Einfluss der drei Aminosäuren H74, T88 und D117 her. Das zweite Bipyridin wird von Tyrosin Y35 ebenfalls über ein  $\pi$ -*stacking* mit einem mittleren Abstand von 4.3 Å koordiniert. Durch diese Wechselwirkungen sind beide Linker nahe an der Gefäßwand angelagert.

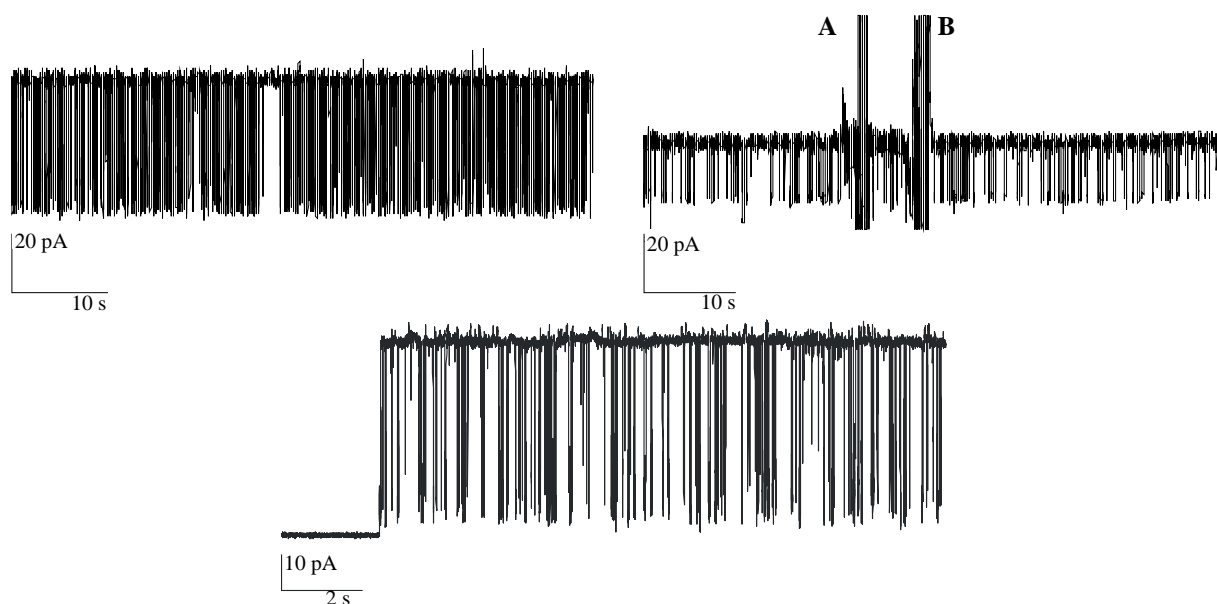


**Abb. 4.15:** Abstände der Bipyridinreste von **80** mit der Poreninnenseite in Å. Y35 und W131 können mit den Bipyridinen auf Grund der räumlichen Nähe wechselwirken. Der sterische Anspruch der Aminosäuren H74, T88 und D117 führt zur Verdrillung eines der Bipyridine.

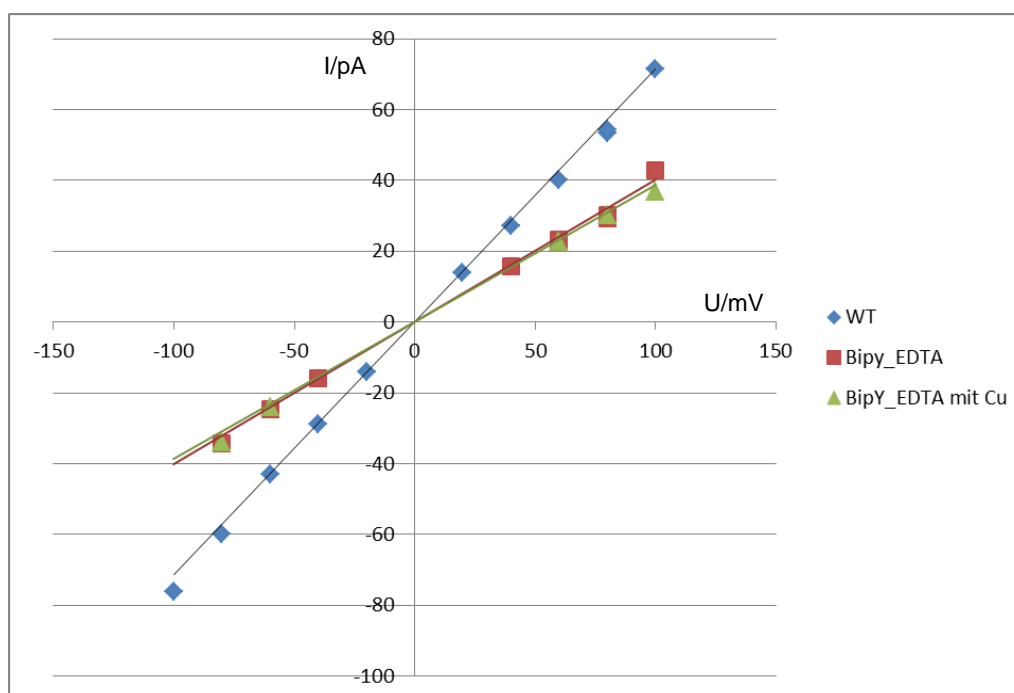
Im Vorfeld zu BLM-Messungen wurde von *D. Nette* mittels *Inductively Coupled Plasma* Massenspektrometrie (ICP-MS) der Kupferanteil im dialysiertem Biohybrid OmpG/ $\Delta$ l6/C13/C154+BiPy bestimmt. Es wurden 3.11 ppb an Cu(II) in der Mutante gefunden, wohingegen in der unmodifizierten Doppelmutante nur 0.03 ppb und im Puffer 0 ppb bestimmt wurden. Da für einen vollständig mit Cu(II)-Ionen gesättigten Biohybrid 100 ppb zu erwarten gewesen wäre, heißt das, dass OmpG/ $\Delta$ l6/C13/C154+BiPy in der Lage sein muss Kupfer zu binden, da das Kupfer selbst nach Dialyse noch gebunden war.<sup>[22]</sup> Weiterhin zeigt sich, dass, selbst wenn Kupferanteile in den Puffern vorhanden sind, diese nicht ausreichen um die Bipyridine vollständig zu komplexieren.

BLM-Messungen dieses Biohybrids wurden von *P. Reiss* durchgeführt. Wie aus Abb. 4.16 und Abb. 4.17 ersichtlich wird, ändert sich, entgegen den Kupferbestimmungen zuvor, die Leitfähigkeit nach Zugabe von Cu(II) nur sehr gering. Im Rahmen der Messgenauigkeit sind die Leitfähigkeiten vor und nach der Zugabe von Kupfer identisch und es könnte in Wahrheit gar keine Änderung der Leitfähigkeit existieren. Ein Indiz für den geringen Einfluss des Kupfersalzes auf die Leitfähigkeit könnte die Kristallstruktur von OmpG/ $\Delta$ l6/C13/C154+**80** geben. Diese lässt auf Wechselwirkungen der Bipyridine mit der Gefäßinnenwand schließen. Mit den gemessenen Kupferanteilen in dem Bipyridin-OmpG-Hybriden und der erhaltenen Kristallstruktur erscheint eine starke Präkoordination mit der Gefäßinnenseite als der

wahrscheinlichste Grund für die erhaltene Unabhängigkeit der Leitfähigkeit von der Kupferkonzentration.



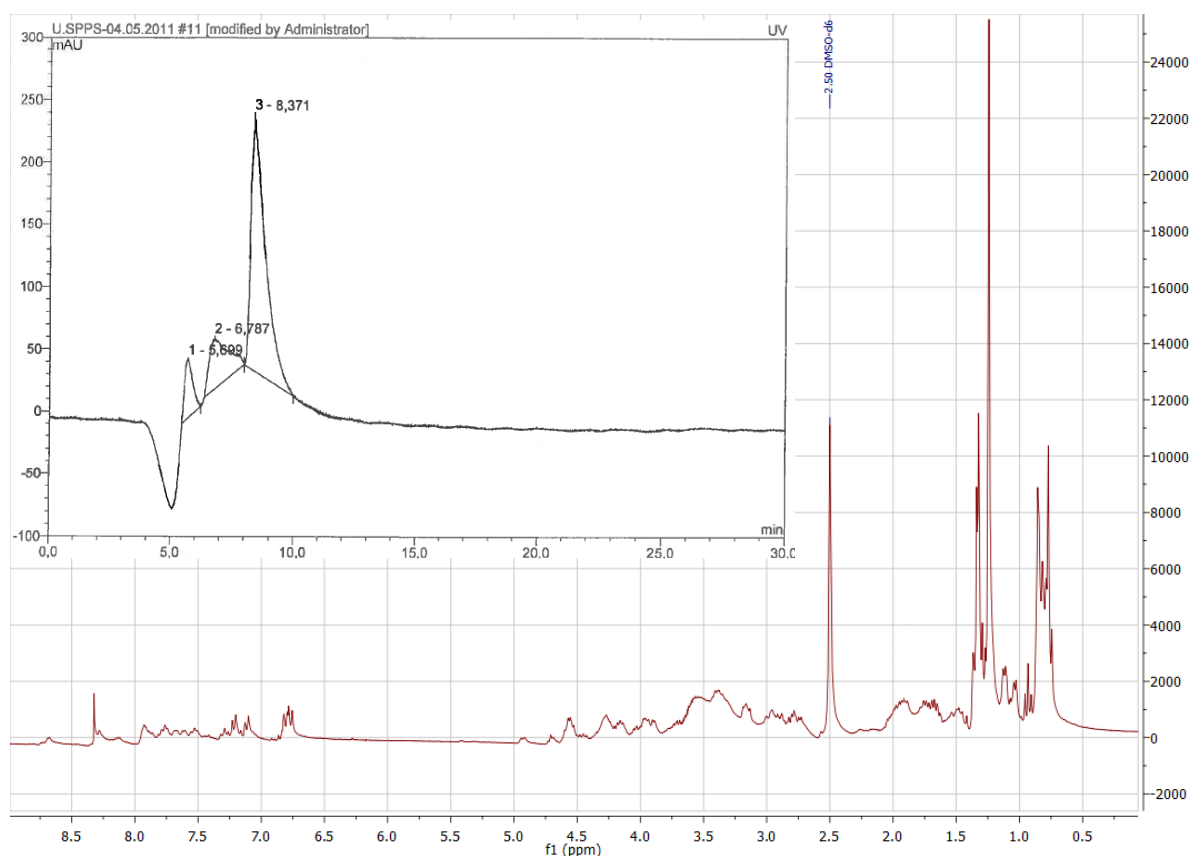
**Abb. 4.16:** Spuren einer repräsentativen BLM-Messung des OmpG-Wildtyps und von OmpG/Δl6/C13/C154+Bipyridin **38**. Links oben: Spur des Wildtyps. Rechts oben: Spur vor und nach Zugabe von CuSO<sub>4</sub> ( $c_{\text{end}} = 0.5 \text{ mM}$ ) und EDTA ( $c_{\text{end}} = 0.25 \text{ mM}$ ) in die *cis*- und *trans*-Seite. Die großen Ausschläge **A** und **B** geben den Zeitpunkt der beiden Zugaben an. Unten: Spur von OmpG/Δl6/C13/C154.



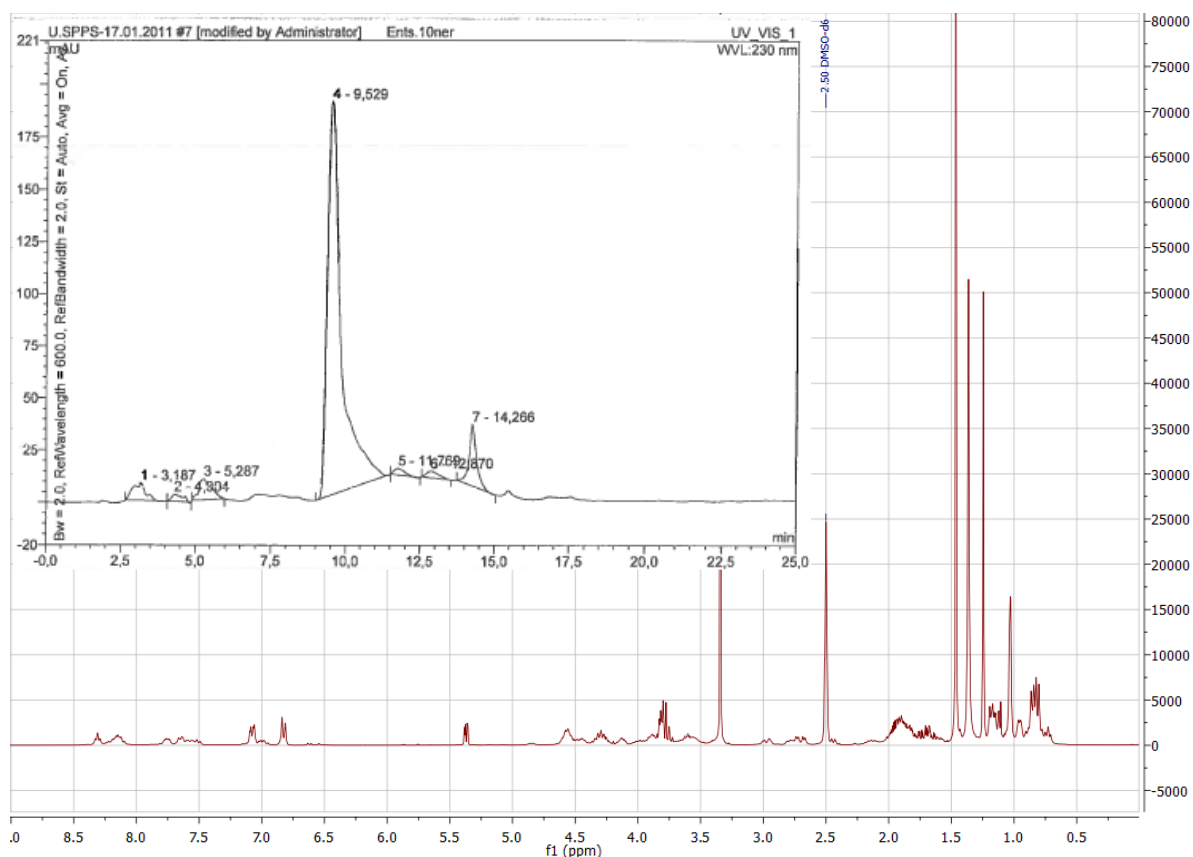
**Abb. 4.17:** Gemessene Leitfähigkeit von OmpG/Δl6/C13/C154 +Bipyridin **38** mit und ohne Kupfer im Vergleich zum Wildtyp. Die Leitfähigkeit der BiPy-Verbindung beträgt  $0.40 \pm 0.05$  (rot, kupferfrei) bzw.  $0.39 \pm 0.07 \text{ nS}$  (grün, kupferhaltig) und ist somit bei ungefähr 55% der Leitfähigkeit des Wildtyps. Die Leitfähigkeit ist nach Zugabe von Kupfer nahezu identisch und im Bereich der Messungenauigkeit gleich.

## 4.2 Ergebnisse bei der Peptidsynthese für VDAC

Sowohl bei der Festphasensynthese als auch bei der Fragmentsynthese sollte das Peptid **117** erhalten werden. Nach der SPPS wurde das Harz mit einer Mischung AcOH/TFE/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> im Verhältnis 1:2:7 behandelt und nach Abtrennen des Harzes die Peptide mit Diethylether ausgefällt. Bei der Fragmentsynthese wurde nach der finalen Kupplung der Methylester des Decamers **89** mit Lithiumhydroxid in einem THF/Wasser-Gemisch entschützt und wässrig aufgearbeitet. Beide Peptide wurden anschließend über HPLC gereinigt, wobei vorallem dies bei dem über SPPS hergestellten Peptid notwendig war, da diese Peptide typischer Weise mit kürzerkettigen Peptiden verunreinigt sind. Nach der HPLC wurden <sup>1</sup>H-NMRs von beiden Verbindungen gemacht. Abb. 4.18 und 4.19 zeigen jeweils das HPLC-Chromatogramm und das NMR-Spektrum der beiden Decapeptide.



**Abb. 4.18** NMR und HPLC Chromatogramm (oben links) von **117** hergestellt über SPPS. Das NMR wurde in DMSO-*d*<sub>6</sub> gemessen. HPLC:  $\lambda = 280$  nm, PLRP-S. A: H<sub>2</sub>O, B: MeCN, 5% B über 30 min, 0.7 mL/min, 30 °C.



**Abb. 4.19:** NMR und HPLC Chromatogramm (oben links) von **117** hergestellt über Fragmentsynthese. Das NMR wurde in DMSO-*d*<sub>6</sub> gemessen. HPLC:  $\lambda$  = 280 nm, PLRP-S. A: H<sub>2</sub>O, B: MeCN, 20% -40% B über 30 min, 0.7 mL/min, 30 °C.

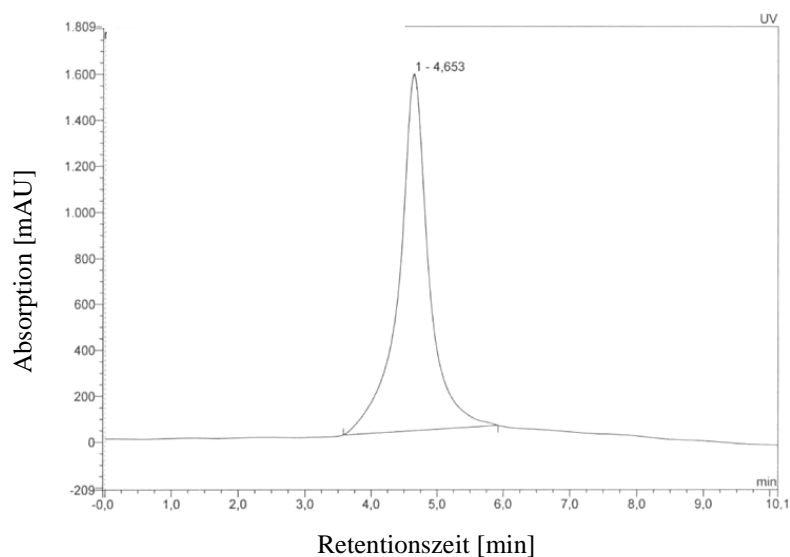
Das über SPPS hergestellte Peptid (Abb. 4.18) zeigte einen hohen Grad an Verunreinigungen, welche auch nach der HPLC-Reinigung nicht komplett abgetrennt wurden. Die Verunreinigungen fallen vorallem im aromatischen Bereich auf. Wenn dieser Abschnitt mit dem über Fragmentsynthese hergestellten Peptid (Abb. 4.19) verglichen wird, fallen sofort die erhöhte Anzahl an amidischen NH-Protonen-Peaks auf. Auch ist im Bereich von 0.5 bis 1.5 ppm ein deutlicher Unterschied zu erkennen, was dafür spricht, dass entweder die Schutzgruppen beim Abspalten entfernt wurden oder die Kupplungen nicht planmäßig funktioniert haben. Da die HPLC-Reinigung nicht in zufriedenstellendem Maße funktioniert hat und alle gemessenen NMRs eine starke Peakverbreiterung aufwiesen, konnten die entstandenen Verbindungen nicht genau identifiziert werden.

In Folge dessen wurde nur mit dem über Fragmentsynthese hergestellten Peptid weitergearbeitet.

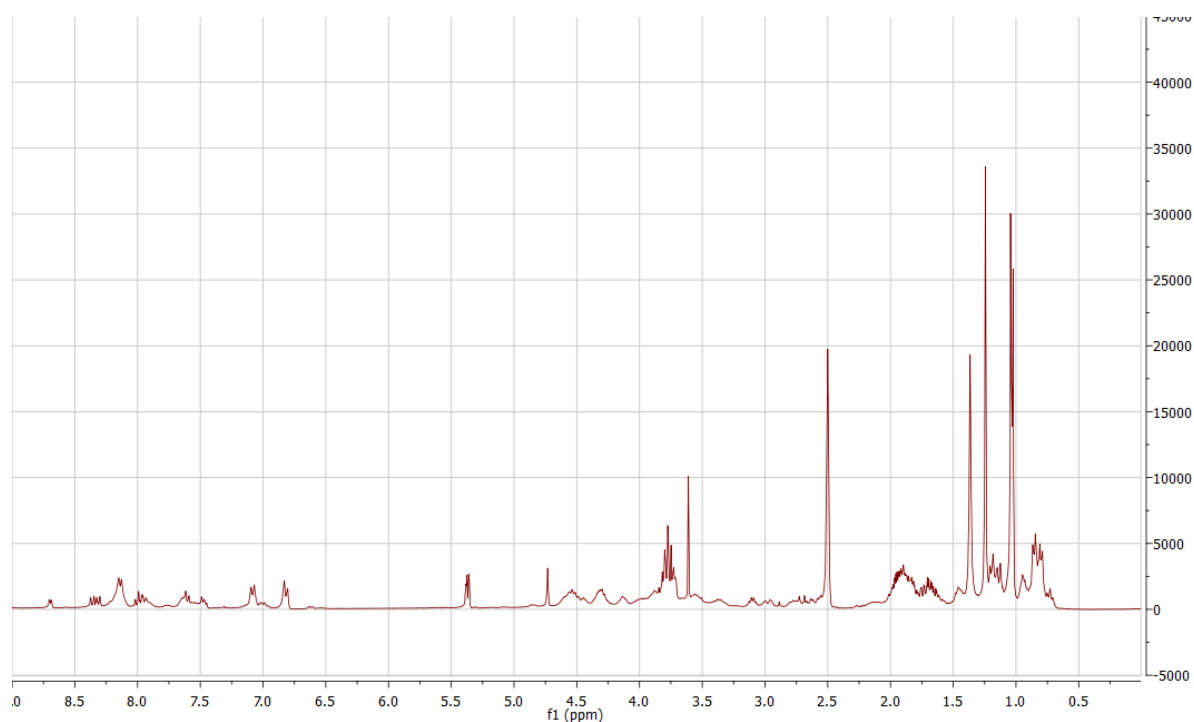
Der entschlützte Aktivester für die native chemische Ligation sollte nach einer Vorschrift von *M. Cebi* hergestellt werden.<sup>[89]</sup> Die Säure **117** wurde mit Ethanthiol aktivverestert und die Kupplungsreagenzien mit einer Filtersäule und einem Eluenten aus Chloroform/Methanol

abgetrennt. Der erhaltene Aktivester sollte mit einem Gemisch aus TFA/TIPSH/EtSH 87.5 : 5 : 7.5 komplett entschützt werden und in Verbindung **88** überführt werden.

Das Produkt der Entschützung des Decamers **117** wurde mit Ether ausgefällt und über eine C18-RP-HPLC aufgereinigt und über Massenspektroskopie sowie  $^1\text{H}$ -NMR charakterisiert. Abb. 4.20 zeigt ein beispielhaftes Chromatogramm nach der Aufreinigung, in Abb. 4.21 ist das dazugehörige NMR in DMSO zu sehen.

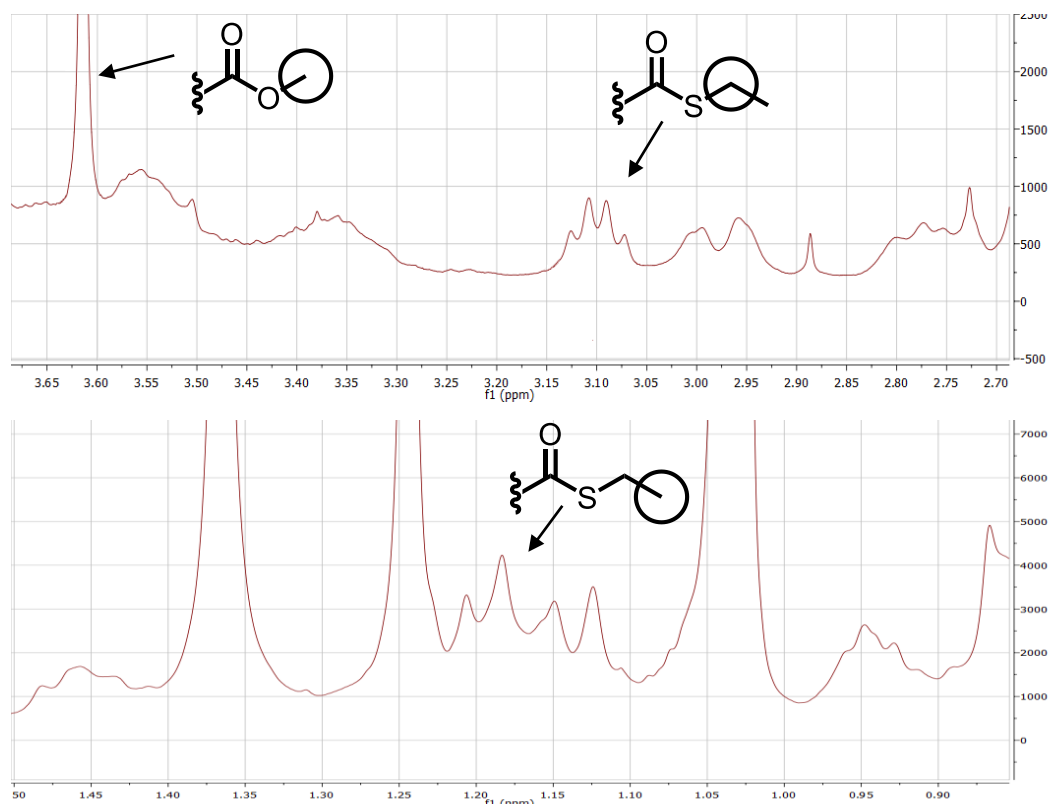


**Abb. 4.20:** HPLC-Chromatogramm nach der kompletten Entschützung der Verbindung **117**.  $t_r = 4.7$  min.  $\lambda = 256$  nm. PLRP-S. A:  $\text{H}_2\text{O}$ , B: MeCN, 10% B isokratisch über 30 min, 0.7 mL/min, 30 °C.



**Abb. 4.21:** NMR von des 10er Peptids nach Kompletterschützung und HPLC-Reinigung.

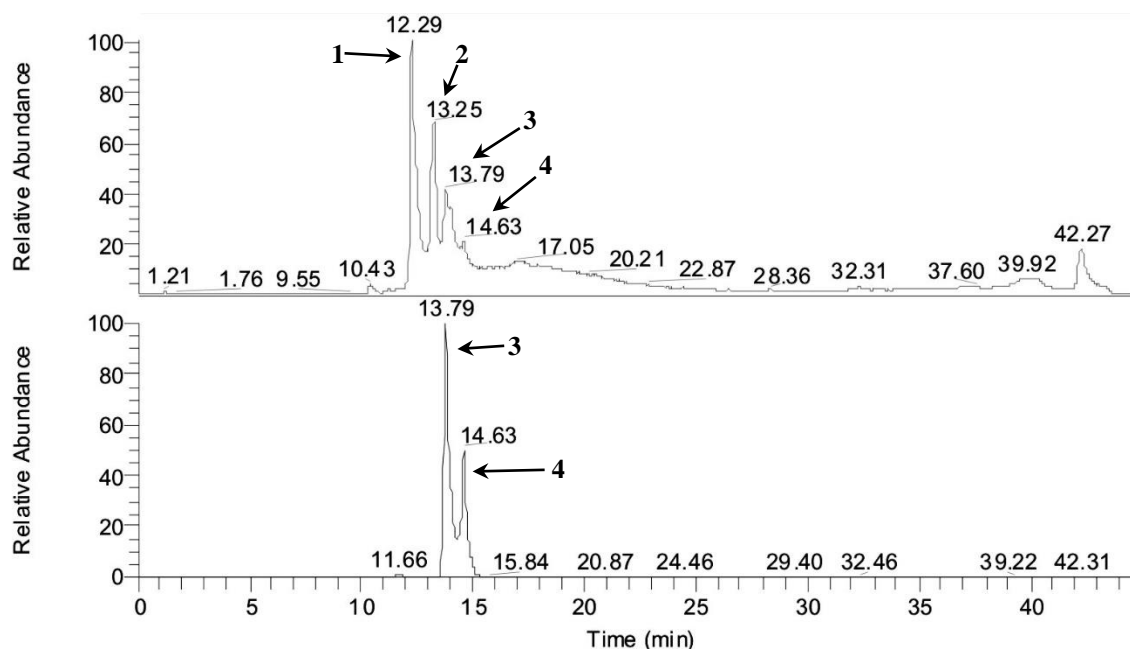
Während die Reinigung per HPLC einen zwar sauberen, aber etwas breiten Peak für das entschützte Peptid ergab, zeigte sich in dem entsprechenden NMR ein Gemisch aus zwei Verbindungen. Bei genauerer Betrachtung zeigen sich in dem Spektrum sowohl ein Singulett bei ungefähr 3.62 ppm, sowie ein Tripletts bei 1.18 ppm und ein Quartett bei 3.10 ppm. Diese Peaks könnten für einen Methylester bzw. einen Thioethylester sprechen. Die entsprechenden Ausschnitte des Spektrums sind in Abb. 4.22 zu sehen.



**Abb. 4.22:** Vergrößerung des NMRs nach der finalen Entschützung. Es zeigt sich ein Gemisch von Thioester und Methylester

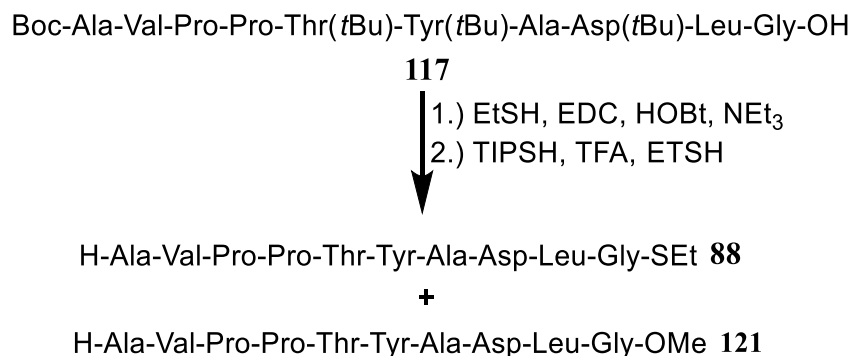
Zur weiteren Untersuchung wurde die erhaltene Verbindung zusätzlich über Massenspektroskopie untersucht. Diese zeigte neben dem gewünschten Molekülpeak auch weiter starke Signale und daraufhin wurde eine LC-MS von J. Bamberger durchgeführt. Das Chromatogramm ist in Abb. 4.23 zu sehen. Es waren vier verschiedene Peaks zu erkennen, wobei immer zwei dieselbe Masse besaßen, was auf ein Rotamerengemisch (wie zuvor in Kapitel 3.2.2 besprochen) zurückzuführen war.





**Abb. 4.23:** LC-MS-Chromatogramm nach Entschützung von **117**. Oben: Übersichtschromatogramm, 1 und 2 haben dieselbe Masse und 3 und 4 haben dieselbe. Unten: Hochauflösung der Peaks 3 und 4. PLRP-S. A: H<sub>2</sub>O, B: MeCN, 10% → 90% B über 35 min, 1.5 mL/min, 25 °C.

Peak 3 und 4 waren dem gewünschte Aktivester **88** zuzuordnen. Peak 1 bzw. 2 allerdings entsprechen einem Molekül mit einer Masse von 1016 Da. Diese Masse, sowie die im NMR erkennbaren Signale für einen Methylester sowie einen Thioethylester sprechen dafür, dass es bei der finalen Entschützung zu einem Gemisch aus Aktiv- und Methylester kam. Da die Methylesterentschützung gelungen war (Abb. 4.19), konnte die Umesterung nur bei der säulenchromatographischen Aufreinigung, bei der mit Methanol eluiert wurde, entstanden sein. Der Massepeak von 1016 Da entspricht somit dem Methylester von Verbindung **88**. Die korrigierte Reaktionsgleichung ist in Schema 52 abgebildet.



**Schema 52:** Korrigierte Reaktionsgleichung der Komplettentschützung des Decamers **117**.

---

Durch das Reproduzieren der von *J. Bamberger* gewählten HPLC-Bedingungen gelang es nicht die Peaks aufzutrennen. Auch das Wechseln der Säule brachte keine Verbesserung des Chromatogramms. Da eine defekte Säule hiermit ausgeschlossen werden konnte und das LC-MS immer noch nicht reproduziert werden konnte, wurde davon ausgegangen, dass es ein Fehler in der HPLC war.

Da Methanol nur bei der säulenchromatographischen Reinigung verwendet wurde, musste die Hydrolyse hierbei stattfinden. Es wurde deshalb versucht **88** nach der wässrigen Aufarbeitung der Aktivveresterung direkt zu entschützen, was allerdings anscheinend zu einer Zersetzung des Edukts führte. Es gelang schlussendlich nicht **88** als saubere Verbindung zu isolieren

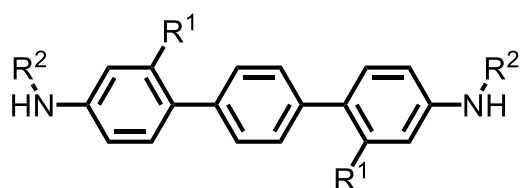
In der Literatur finden sich erstaunlicherweise keine Beispiele für Hydrolysen eines Thioesters mit reinem Methanol, allerdings es ist weithin bekannt, dass Thioester mit Wasser hydrolysieren. Kinetikmessungen an bestimmten Thioestern wie zum Beispiel einem Ubc9~SUMO-1 Thioester Intermediat<sup>[116]</sup> zeigten eine Halbwertszeit des entsprechenden, nativen Thioesters von 3.6 h. Unter denaturierenden Bedingungen hingegen konnte gezeigt werden, dass der Thioester langsamer hydrolysiert. Dieselben kinetischen Untersuchungen wurden an dem Testsystem Ac-Cys(S-Gly-H)-OH durchgeführt. Obwohl dieses Testsystem weniger sterischen Anspruch besitzt und der Thioester einfach zu hydrolysieren sein sollte, wurde festgestellt, dass die Hydrolyse langsamer abläuft als die des Proteins. Hieraus lässt sich schließen, dass die 3D-Struktur des Proteins einen moderaten Einfluss auf die Verseifung haben muss.

Da Methanol eine höhere Nukleophilie besitzt als Wasser sollte davon auszugehen sein, dass die Umesterung eines Thioesters mit Methanol zumindest im selben Größenordnungsbereich liegt. Dies wird in der Literatur allerdings nicht beobachtet und zur vollständigen Umesterung werden basische Bedingungen benötigt. Da allerdings diese Umesterung bei Verbindung **118** stattfand muss dabei die 3D-Struktur in Lösung einen entscheidenden Einfluss haben, wie auch schon *Song et al.*<sup>[116]</sup> festgestellt haben. Es könnte zu einer Vorkoordination des Methanols kommen, wodurch die Acidität des Methanols steigt und so eine Umesterung erleichtert wird.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Nach erfolgreichen Ein-Punkt-Anknüpfungen an OmpG und OmpF mittels Iodacetamiden sollten kovalente Lösungen für Zwei-Punkt- oder *pseudo*-Zwei-Punkt-Anknüpfungen gefunden werden. Hierzu wurden Bibliotheken kleiner, symmetrischer Moleküle hergestellt, welche meistens in 3-4 Stufen hergestellt werden konnten.

Die Synthese der Terphenyl-Derivate erfolgte nach modifizierten Synthesen von *M. C. Davis*.<sup>[88]</sup> Es gelang Terphenyle mit diversen Funktionalitäten wie Carbonsäuren (**43**), Diethylenglycolester (**51** und **52**) und Sulfonaten (**58**) herzustellen und in die entsprechenden Bromacetamide **53**, **54** und **59** zu überführen (Schema 53). Von diesen hergestellten Terphenylen eigneten sich die Carbonsäurederivate **43**, **53** und **54** nicht für eine Modifikation von OmpG, da diese nur in stark polar, aprotischen Lösungsmitteln löslich waren. Diese Lösungsmittel denaturieren allerdings das Porin.



**43:**  $R^1 = \text{COOH}$ ,  $R^2 = \text{H}$

**53:**  $R^1 = \text{CO}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{OH}$ ,  $R^2 = \text{COCH}_2\text{Br}$

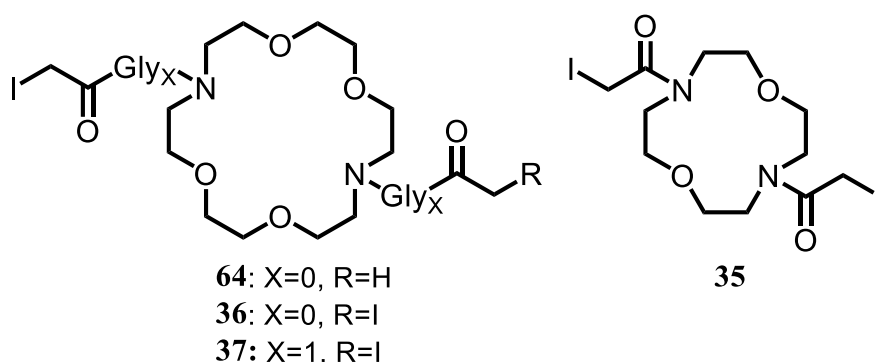
**54:**  $R^1 = \text{CO}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{OEt}$ ,  $R^2 = \text{COCH}_2\text{Br}$

**59:**  $R^1 = \text{SO}_3\text{K}$ ,  $R^2 = \text{COCH}_2\text{Br}$

Schema 53: Dargestellte Terphenyle

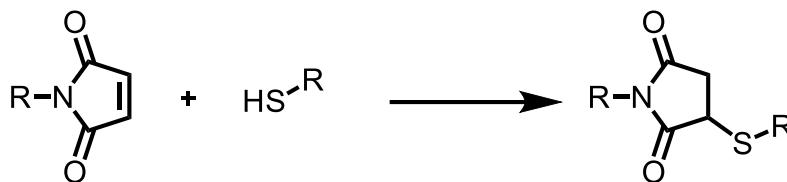
Mit **59** wurde eins von wenigen in der Literatur bisher synthetisierten ionischen *para*-Terphenylen mit 34% Gesamtausbeute über vier Stufen hergestellt.<sup>[110, 111]</sup> Mit diesem wurden Testumsätze zur Bestimmung der Kinetik unternommen. Weiterhin wurde versucht, dieses im quantitativen Maßstab umzusetzen und versucht den Biohybrid zu kristallisieren. Das langsame Kristallwachstum, die relativ schnelle Hydrolyse in pH 8.0 Puffer und die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse bei den Kinetikversuchen, z.B. dass es vollständigen Umsatz von OmpG bei nur 0.5 eq des Terphenyls **59** gab (Kapitel 4.1.1), könnten für eine unspezifische Bindung von **59** mit dem Porin, anstatt für eine reale Zwei-Punkt-Anknüpfung sprechen. Um Klarheit zu erhalten müssten die erhaltenen Kristalle vermessen werden, was zum Zeitpunkt dieser Arbeit allerdings noch nicht erfolgt war.

Auf der Route der Kronenether gelang es vier verschiedene Derivate herzustellen (Schema 54). Die Verbindungen **35**, **36** und **64** zeigten Umsatz mit OmpG, allerdings wurde im denaturierten Zustand nur Spuren von eventuell querverknüpft funktionalisiertem Protein gefunden. Die große Krone **37** konnte in drei Stufen mit 36% Gesamtausbeute hergestellt werden. Die Reaktion mit OmpG zeigte im SDS-PAGE-Gel eine starke Bande, die auf eine Quervernetzung hindeutete. Versuche diese Bande mittels Biotinylierung und anschließender Affinitätschromatographie sowie Fractogel® DEAE-Ionenaustauschchromatographie aufzureinigen brachten keine Auftrennung der Produkte. Hierbei sollten die unreagierten Iodide der Kronenlinker mit einem Biotinmarker reagieren und anschließend sollen die biotinylierten Ein-Punkt-Anknüpfungen für eine Avidin-Säule von den querverknüpften Produkten getrennt werden. Diese Aufreinigung gelang nicht und könnte auf die Hydrolyse der Iodide im basischen Puffermilieu zurückzuführen sein. Kristallisationsansätze führten zu dreidimensionalem Kristallwachstum, allerdings waren die daraus erhaltenen Datensätze bisher ungenügend um eine aussagekräftige Kristallstruktur zu erhalten.



**Schema 54:** Dargestellte Bisiodoacetamidkronen **35**, **36**, **37** und **64**.

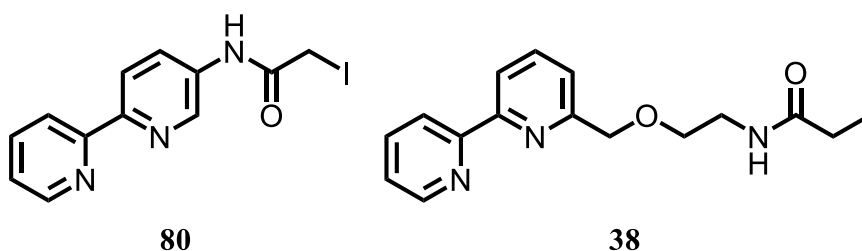
Bei den Terphenylen und den Kronen-Derivaten ist die Aufreinigung der modifizierten Pore ein Problem. Weiterhin scheinen die Halogenide in den Pufferbedingungen zu schnell zu hydrolysieren, wodurch eine doppelte Reaktion eines Moleküls mit der Gefäßinnenseite unwahrscheinlicher wird. Es könnten gegen Hydrolyse stabilere reaktive Gruppen wie zum Beispiel Maleimid-Linker<sup>[117, 118]</sup> verwendet werden, welche zwischen pH-Werten von 6.5 bis 7.5 über eine Micheal-Addition irreversibel mit Cysteinen reagieren (Schema 55) und hydrolysestabil sind. Für die Azakronen wurden schon erste Versuche unternommen, diese Linker zu synthetisieren, aber bisher führten diese Versuche zur Zersetzung der Edukte.



**Schema 55:** Reaktion zwischen einem Maleimid und einem Thiol über eine 1,4-Addition.

Bei den Kronen bietet sich weiterhin an Anzahl der Glycin-Rest zu erhöhen oder allgemein die Linkerlänge zu vergrößern, um damit eine höhere Flexibilität und damit eine höhere Wahrscheinlichkeit einer Reaktion zu erhalten. Weiterhin könnte die Aufarbeitung einfacher werden, da der Modulator, wenn dieser nur einfach angeknüpft ist, weiter aus der Porenöffnung hinausschauen würde und damit vielleicht ein verändertes Chromatographieverhalten erreicht wird.

Von den beiden hergestellten Bipyridinderivaten **38** und **80** für die *pseudo*-Zwei-Punkt-Anknüpfung zeigt nur **38** aufgrund der vermehrten Freiheitsgrade einen vielversprechenden Umsatz (Schema 56).<sup>[22]</sup> Es wurde in fünf Stufen mit 45% Gesamtausbeute hergestellt.



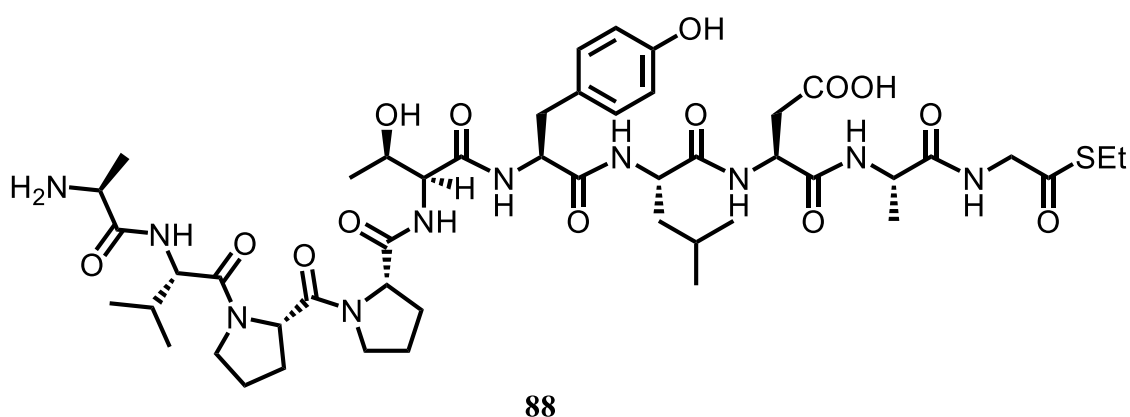
**Schema 56:** Dargestellte Bipyridine **38** und **80**.

Der Biohybrid konnte kristallisiert und die Röntgenstruktur verfeinert werden. BLM-Messungen zeigten keine Abhängigkeit von der Kupferkonzentration, was darauf schließen lässt, dass es nicht zu einer Komplexierung des Kupfers von den Bipyridinen in der Pore kommt. Schon vor Zugabe von Kupfer konnte Cu(II) im Biohybrid nachgewiesen werden. Dies könnte bedeuten, dass die Bipyridine schon komplett mit Kupfer gesättigt sind indem die diese Kupfer aus dem Puffer herausziehen oder, wie die Kristallstruktur zeigt, die Bipyridine mit der Gefäßwand zu starke Wechselwirkungen eingehen und dadurch das Kupfer nicht mehr komplexieren können.. In Verbindung mit den Kupferbestimmungen von *D. Nette* scheint die Koordination mit der Gefäßwand am wahrscheinlichsten zu sein. Zur genauen Bestimmung müssten weitere Versuche unternommen bzw. OmpG-Mutanten hergestellt

---

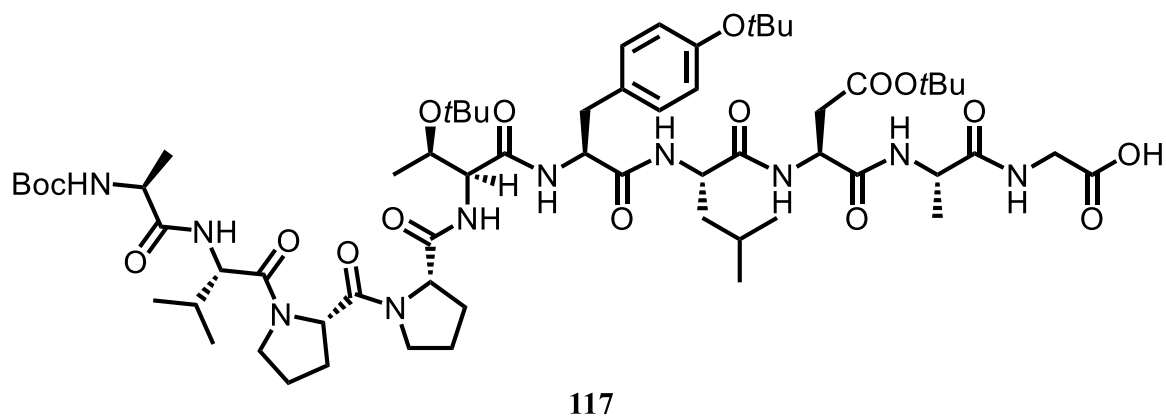
werden. Weiterhin könnte durch Zugabe anderer komplexbildender Übergangsmetalle wie zum Beispiel Ruthenium eine Koordination der Bipyridine erzwungen werden.

Zur Modifikation von VDAC sollte eine Mutante mit deletierter  $\alpha$ -Helix verwendet werden. Diese sollte mit Peptidthioestern mittels *nativer chemischer Ligation* funktionalisiert werden. Hierzu wurde versucht Decapeptid **88**, welches der nativen Sequenz der VDAC  $\alpha$ -Helix nachempfunden ist (Schema 57), einerseits über SPPS und andererseits über Fragmentsynthese in Lösung herzustellen.



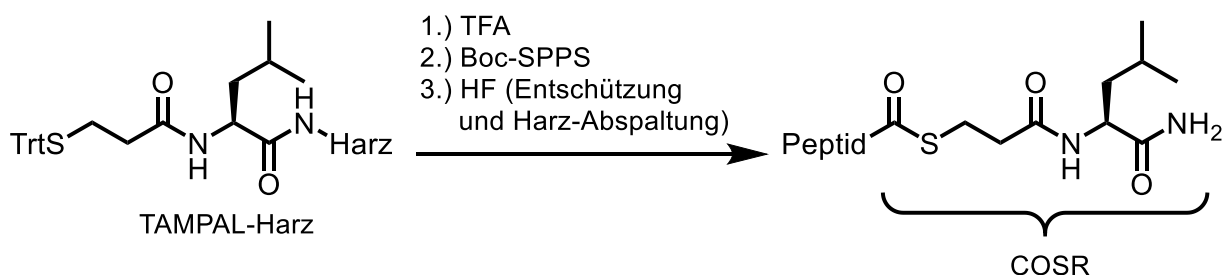
**Schema 57:** Decapeptid **88** für die native chemische Ligation an VDAC.

Ein direkter Vergleich der über die beiden Methoden hergestellten Peptide **117** (Schema 58) zeigte nach HPLC-Reinigung im  $^1\text{H}$ -NMR starke Verunreinigungen in dem über SPPS hergestelltem Peptid. Diese Verunreinigungen konnten nicht abgetrennt werden, weshalb mit dem Peptid aus der Fragmentsynthese weitergearbeitet wurde. Decamer **117** konnte in neun linearen Stufen mit 47% Gesamtausbeute hergestellt. Die Herstellung des Thioesters und anschließende Entschützung führte zu einem Gemisch aus Aktivester **88** und Methylester **121**, die nicht mehr voneinander getrennt werden konnten. Alle Versuche, **121** abzutrennen oder den Aktivester **88** sauber herzustellen, schlugen fehl und es konnten immer nur Gemische erhalten werden.



**Schema 58:** Über Fragmentsynthese hergestelltes Peptid **117**.

Ein Weg, den Aktivester sicher zu erhalten, kann über ein TAMPAL (Trityl-Associated Mercaptopropionic Acid-Leucline)-Harz erreicht werden (Schema 59).<sup>[119]</sup> Hierbei wird an ein Harz, das geeignet ist für eine Boc-SPPS wie zum Beispiel ein MBHA-Harz, in drei Stufen mit Leucin und *S*-Trityl-2-Mercaptopropionsäure umgesetzt. An diesem Harz kann dann über eine SPPS das gewünschte Peptid aufgebaut werden und mit dem Thioester vom Polymerträger abgespalten werden. Das so erhaltene Peptid kann dann, mit Zugabe von Thiolquellen wie Thiophenol, direkt in einer NCL umgesetzt werden. Dieser Weg würde Aufarbeitungsschritte sparen und somit die Hydrolyse des Aktivester wahrscheinlich verhindern.



**Schema 59:** Darstellung eines Thioesters mittels Boc-Chemie an einem TAMPAL-Harz. Der Aktivester wird während der SPPS synthetisiert und mit vom Harz abgespalten.

---

## **6. Experimenteller Teil**

### **6.1 Allgemeine Bedingungen**

#### **6.1.1 Lösungsmittel und Schutzgasarbeiten**

**Dichlormethan:** Erhitzen unter Rückfluss mit Calciumhydrid und anschließende Destillation.

**Diethylether:** Vortrocknen über Kaliumhydroxid. Erhitzen unter Rückfluss mit Solvona<sup>®</sup> und anschließende Destillation.

**N,N-Dimethylformamid** wurde in HPLC-grade Qualität bzw. in *peptide-grade* gekauft und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

**Ethanol:** Erhitzen unter Rückfluss mit Magnesiumspänen (5g/L) und anschließende Destillation.

**Methanol:** Erhitzen unter Rückfluss mit Magnesiumspänen (5g/L) und anschließende Destillation.

**Tetrahydrofuran:** Vortrocknen über Kaliumhydroxid. Erhitzen unter Rückfluss mit Natrium und anschließende Destillation. Verwendung von Benzophenon als Feuchtigkeits- und Sauerstoffindikator.

**Triethylamin:** Erhitzen unter Rückfluss mit Calciumhydrid und anschließende Destillation.

Alle verwendeten Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer von höhersiedenden Verunreinigungen abdestilliert. Alle kommerziell erhältlichen Reagenzien wurden, soweit nicht anders angegeben, ohne weitere Reinigung verwendet.

#### **6.1.2 Schutzgasarbeiten und Lichtausschluss**

Alle Reaktionen mit hydrolyse- oder sauerstoffempfindlichen Substanzen wurden in ausgeheizten Apparaturen unter Argonatmosphäre durchgeführt. Es wurde eine



Wechselhahnanlage mit einer Drehschiebervakuumpumpe (*Edwards RV8*, Enddruck etwa  $10^{-2}$  mbar) verwendet. Spritzen und Kanülen wurden vor Verwendung mit Argon gespült. Alle Alkyl iodide wurden in Braunglaskolben bei  $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Entgaste Lösungsmittel wurden unter Argonatmosphäre in einem Schutzgaskolben mit flüssigem Stickstoff eingefroren und unter Vakuum aufgetaut. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt und anschließend wurde das Lösungsmittel unter Argon gelagert. Vor jeder Entnahme des Lösungsmittels wurde erneut wie oben beschrieben einmal eingefroren und aufgetaut.

### 6.1.3 Chromatographie

**Dünnschichtchromatographie:** Für Reaktionskontrolle wurden DC-Fertigplatten Kieselgel 60 auf Glas mit Fluoreszenzindikator  $F_{254}$  der Firma *Merck* verwendet. Die erhaltenen Chromatogramme wurden durch Fluoreszenzauslöschung mit einer UV-Lampe ( $\lambda = 254\text{ nm}$ ) und durch Anfärben mit den folgenden Lösungen ausgewertet:

**Kaliumpermanganat-Tauchlösung:** 3.00 g Kaliumpermanganat, 20.0 g Natriumhydrogencarbonat, 5 mL 5%ige Natriumhydroxid-Lösung, 240 mL Wasser.

**Ninhydrin-Tauchlösung:** 100 mL 1-Butanol, 243 mg (0.3 %) Ninhydrin.

**Cer(IV)-sulfat/Molybdophosphorsäure-Tauchlösung:** 400 mg Cer(IV)-sulfat, 10.0 g Ammoniummolybdat-Hexahydrat, 10 mL konzentrierte Schwefelsäure, 90 mL Wasser.

**Flashchromatographie:** Präparative Flashchromatographie wurde an Kieselgel 60 der Firma *Mecherey-Nagel* (Korngröße 40-63  $\mu\text{m}$ , 230-400 mesh) unter Überdruck durchgeführt. Kieselgelmenge, Säulengröße und Fraktionsgröße wurden in Anlehnung an die Empfehlung von *Still* gewählt.<sup>[120]</sup> Kieselgel wurde durch Spülen mit dem entsprechenden Laufmittel mit Zusatz von 1% wässriger Ammoniak Lösung deaktiviert.

---

**Analytische HPLC:** HPLC-Messungen wurden an einer Gerätekombination aus zwei SD-200 Pumpen und einem Absorptionsdetektor UV-1 der Firma *Rainin Dynamax DA* bei einer Säulentemperatur von 30 °C aufgezeichnet. Für Normal-Phasen-HPLC-Chromatogramme wurde eine *Varian Microsorb 60-8-S1* Säule (25 cm) der Firma *Dynamax*, für *reversed-phase*-HPLC-Chromatogramme wurde eine *NUCLEODUR 100-5 C18ec* (25 cm, 4.6 mm) der Firma *Macherey-Nagel* eingesetzt. Es wurden HPLC-grade Lösungsmittel der Firma *J. T. Baker* verwendet, die vor Gebrauch im Ultraschallbad unter Membranpumpenvakuum entgast wurden.

#### 6.1.4 Automatisierte Synthese von Peptiden an fester Phase (SPPS)

Die Synthese der Peptide erfolgte an einem automatisierten Festphasenpeptidsynthesizer APEX 396 der Firma Advanced ChemTech an einem 2-Chlortritylchlorid Harz auf Basis von mit Divenylbenzol quervernetzten Polystyrol (Iris Biotech). Die verwendeten Lösungsmittel DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und Methanol (Merck Bioscience), sowie die Base Diisopropylethylamin (DIPEA) (Sigma Aldrich) wurden in *peptide grade* gekauft. Die Kupplungsreagenzien HOBt·H<sub>2</sub>O und HUBt wurden im Kilogrammmaßstab von Iris Biotech erworben. Die Synthese erfolgte nach der Fmoc/*tert*-Butyl-Strategie mit jeweils einer Harzbeladung von 100 µmol. Die Reaktionen wurden in Teflon-Reaktionsblöcken durchgeführt. Pro Kupplung wurden doppelt mit jeweils 3 eq Aminosäure (in 60 µL DMF), 3 eq. HOBt·H<sub>2</sub>O (in 300 µL DMF), 2.7 eq. HUBT (in 540 µL DMF) und 11 eq. DIPEA (in 300 µL DMF) gekuppelt. Vor der Kupplung der ersten Aminosäure, sofern das Harz nicht vorbeladen gekauft wurde, wurde es in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> aufgequellt und anschließend das Lösungsmittel abgesaugt. Zum Kuppeln wurde daraufhin das Harz mit 3 eq der Aminosäure (in 60 µL DMF) und 8 eq DIPEA (in 300 µL DMF) versetzt und geschüttelt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel abgesaugt und mit DMF gewaschen. Die nicht reagierten Endgruppen wurden mit MeOH zum Deaktivieren versetzt und geschüttelt. Zum Abspalten der Fmoc-Schutzgruppen nach jeder Kupplung im Syntheszyklus wurde eine 20%ige Piperidin-Lösung in DMF verwendet. Nach beendeter Festphasensynthese wurde das Peptid mit einer Mischung aus AcOH/TFE/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:2:7 V/V/V (3 mL) für 2h geschüttelt um das Peptid vom Harz zu spalten. Das Lösungsmittel wurde abgesaugt und das Harz anschließend zweimal mit jeweils 1.5 mL derselben Lösung gewaschen.

### 6.1.5 SDS-PAGE

Für SDS-PAGEs wurden ausschließlich selbstgegossene Gele bestehend aus einem Sammelgel (4% Arcylamid, pH 6.8) und einem Trenngel (12% Arcylamid, pH 8.8) verwendet. Die genaue Zusammensetzung der Gele findet sich in Tabelle 1. Der Lauf-Puffer bestand aus 25 mM Tris·HCl, 200 mM Glycin und 0.1% (w/v) SDS. Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Gele mittels Coomassie angefärbt (0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250, 5% HOAc, 50% (v/v) EtOH), entfärbt wurde der Hintergrund mit einer Lösung aus 5% (v/v) HOAc und 28% (v/v) 2-Propanol.

Tab. 1: Zusammensetzung der verwendeten SDS-PAGE-Gele für 100 mL Gel

	12% Trenngel	4% Sammelgel
Trenngel-Puffer (1.125 M Tris·HCl, pH 8.8, 30% (w/v) Saccharose)	33.4 mL	
Sammelgel-Puffer (625 mM Tris·HCl, pH 6.8)		20 mL
<i>d</i> H <sub>2</sub> O	25 mL	64.54 mL
10% (w/v) SDS	1 mL	1 mL
TMEDA	100 µL	100 µL
30% (w/v) Acrylamidlösung (Acrylamid/Bisacrylamid 37.5:1)	40 mL	13.4 mL
10% (w/v) APS	500 µL	1 mL

### 6.1.6 Physikalische Daten

**Kernresonanzspektroskopie:** NMR-Spektren wurden an *ARX 300*, *AV 300*, *DRX 400*, *DRX 500*, *DRX 600* Spektrometern der Firma *Bruker Physics* bei Raumtemperatur gemessen. Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  sind in ppm angegeben, zur Kalibrierung der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren wurde das Restprotonensignal der zur Messung eingesetzten deuterierten Lösungsmittel verwendet (CDCl<sub>3</sub>:  $\delta$  = 7.26 ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>:  $\delta$  = 2.50 ppm, MeCN-*d*<sub>3</sub>:  $\delta$  = 1.94 ppm). <sup>13</sup>C-NMR-Spektren wurden breitbandentkoppelt aufgenommen und auf das

---

Lösungsmittel kalibriert ( $\text{CDCl}_3$ :  $\delta = 77.16$  ppm,  $\text{DMSO}-d_6$   $\delta = 39.52$ ,  $\text{MeCN}-d_3$ :  $\delta = 1.32$  ppm). Eine Zuordnung der Signale erfolgte mittels 2D-NMR-Spektroskopie (COSY, HMQC, HMBC). Das für die NMR-Messungen verwendete  $\text{CDCl}_3$  wurde über basischem Aluminiumoxid filtriert, um Spuren von DCl zu entfernen.

**Infrarotspektroskopie:** Infrarotspektren wurden mit einem *IFS 200* Interferometer der Firma *Bruker Physics* aufgenommen. Die Lage der Absorptionsbanden ist in Wellenzahlen ( $\text{cm}^{-1}$ ) angegeben. Die Intensität der Banden wird durch die folgenden Abkürzungen beschrieben: breit (br), stark (s), mittel (m) und schwach (w).

**Massenspektrometrie:** Massenspektren wurden durch die Routineanalytik des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg aufgenommen. Die Messungen erfolgten mit einem *LTQ-FT* (HR-ESI) der Firma *Thermo Fischer Scientific*, einem *QStar Pulsar i* (HR-ESI) der Firma *Applied Biosystems*, sowie einem *CH7* (EI), *TSQ7000* (EI und ESI) und *MAT95* (HR-ESI und HR-EI) der Firma *Finnigan*. Die Ionenmassen  $m/z$  werden in  $u$  angegeben, bei EI-Messungen betrug die Ionisierungsenergie 70 eV.

**Einkristall-Röntgenstrukturanalyse:** Einkristall-Röntgendiffraktogramme wurden in der Zentralen Abteilung für Kristallstrukturanalyse des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg von *G. Geisler*, *R. Riedel* und *K. Harms* an einem *IPDS2* Diffraktometer der Firma *Stoe* aufgenommen. Die Analyse der Reflexdaten wurde von *K. Harms* mit dem Programmpaket *SHELXL98* durchgeführt.

**Drehwerte:** Drehwerte wurden mit einem Polarimeter des Typs *Perkin Elmer 241* gemessen. Es wurden getrocknete Lösungsmittel verwendet. Die Drehwerte  $[\alpha]$  sind in  $[\text{mL} (\text{mg} \cdot \text{dm})^{-1}]$  und die Konzentrationen  $c$  in  $[\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}]$  angegeben

**Schmelzpunkte:** Schmelzpunkte wurden mit einem *Stuart SMP10* Heizmikroskop in einer einseitig offenen Kapillare bestimmt und nicht korrigiert.

**Molmassen/Dichten:** Die Angabe der Molmasse erfolgt in  $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ , Dichten  $\delta$  sind in der Einheit  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  angegeben.

### 6.1.7 Sprache

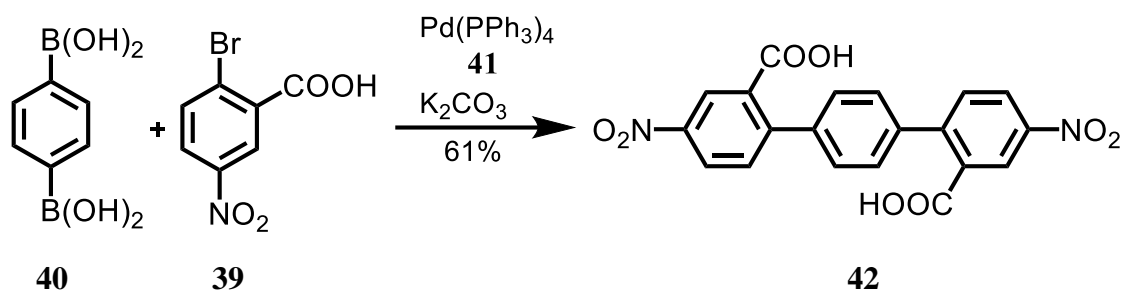
**Sprache:** Um eine spätere Publikation bislang unveröffentlichter Ergebnisse in den gängigen englischsprachigen Fachzeitschriften zu erleichtern, wurden die Versuchsbeschreibungen nach Absprache mit dem Promotionsausschuss in englischer Sprache verfasst.

---

## 6.2 Synthesevorschriften

### 6.2.1 Synthese der Terphenyle

#### 6.2.1.1 4,4''-Dinitroterphenyl-2,2''-dicarboxylic acid **42**



diboronic acid <b>40</b> [165.75]	165 mg	1.0 mmol	1.0 eq
benzoic acid <b>39</b> [246.01]	492 mg	2.0 mmol	2.0 eq
2 M aq. K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> [138.21]	2.00 mL	4.0 mmol	4.0 eq
Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> <b>41</b> [1155.56]	12.0 µg	0.1 mmol	0.1 eq

Diboronic acid **40** (165 mg, 1.0 mmol) and benzoic acid **39** (492 mg, 2.0 mmol) were dissolved in THF (4 mL) and a 2 M aq. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-solution (2.00 ml, 4.0 mmol) in degassed water was added. The solution was heated to 60 °C until all compounds were dissolved and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> **41** (12.0 µg, 0.1 mmol) was added. The mixture was heated to reflux and stirred overnight. After cooling to RT the reaction was filtered, acidified with 1 M aq. HCl and the solvents were removed under reduced pressure. The remaining crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/HCOOH 100:0:1 → 100:1:1) to give terphenyl **42** (293 mg, 0.61 mmol, 61%) as an amorphous, slightly yellow solid.

**TLC:**  $R_f = 0.50$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/HCOOH 10:1:0.1).

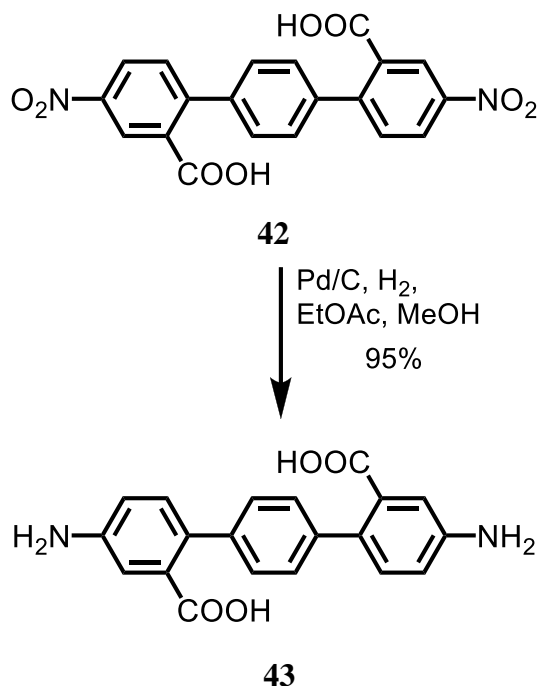
**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta = 7.53$  (s, 4H, H-2', H-3', H-5', H-6'), 7.75 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-5, H-5'), 8.42 (dd,  $J = 2.5, 8.5$  Hz, 2H, H-6, H-6'), 8.52 (d,  $J = 2.5$  Hz, 2H, H-2, H-2').

**$^{13}\text{C}$ -NMR:** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 124.1 (2C, C-2, C-2'), 125.4 (2C, C-6, C-6'), 128.4 (4C, C-2', C-3', C-5', C-6'), 132.3 (2C, C-5, C-5''), 133.6 (2C, C-1', C-4'), 138.8 (2C, C-4, C-4''), 146.4 (2C, C-3, C-3''), 146.5 (2C, C-1, C-1''), 167.6 (2C, C=O).

**IR:** (neat): 2970 (w), 2879 (w), 2649 (w), 2548 (w), 1703 (m), 1676 (s), 1606 (m), 1582 (w), 1518 (s), 1478 (w), 1438 (m), 1346 (s), 1316 (m), 1278 (s), 1174 (w), 1150 (w), 1121 (w), 1083 (w), 1033 (w), 1000 (w), 931 (m), 909 (m), 833 (m), 801 (m), 746 (m), 719 (m), 688 (m), 652 (w), 606 (w), 536 (m), 409 (w).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 431.0486; found 431.0489.

#### 6.2.1.2 4,4''-Diaminoterphenyl-2,2''-dicarboxylic acid **43**



terphenyl <b>42</b> [348.35]	101 mg	0.25 mmol	1.0 eq
palladium on carbon [10% w/w]	26.0 mg	0.03 mmol	0.1 eq

Terphenyl **42** (101 mg, 0.25 mmol) was dissolved in EtOAc (5 mL) and MeOH (1 mL) and palladium on carbon (10% w/w, 26.0 mg, 0.03 mmol) was added. The solution was flushed with hydrogen and stirred for 24 h. The reaction was filtered over celite and the solvents were removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (EtOAc/MeOH/MeCN/H<sub>2</sub>O 6:1:1:1) to give terphenyl **43** (82 mg, 0.24 mmol, 95%) as an amorphous, colorless solid.

**TLC:**  $R_f$  = 0.36 (EtOAc/MeOH/MeCN/H<sub>2</sub>O 3:1:1:1).

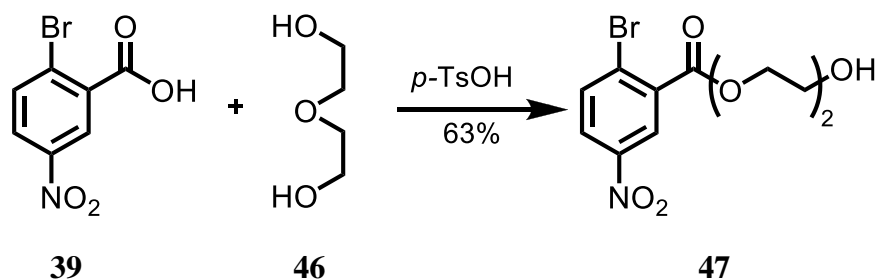
**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 6.65 (dd,  $J$  = 1.8, 8.0 Hz, 2H, H-6, H-6''), 6.81 (d,  $J$  = 1.7 Hz, 2H, H-2, H-2''), 7.02 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2H, H-5, H-5''), 7.21 (s, 4H, H-2', H-3', H-5', H-6').

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 115.7 (2C, C-2, C-2'), 120.1 (2C, C-5, C-5'), 120.4 (2C, C-6, C-6'), 126.1 (2C, C-4, C-4'), 127.3 (4C, C-2', C-3', C-5', C-6'), 129.4 (2C, C-3, C-3'), 139.6 (2C, C-1', C-4'), 146.4 (2C, C-1, C-1'), 165.1 (2C, C=O).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 371.1002; found 371.1004.

### 6.2.1.3 2-(2-Hydroxyethoxy)ethyl 2-bromo-5-nitrobenzoate **47**<sup>19</sup>

1)



2-bromo-5-nitrobenzoic acid <b>39</b> [246.01]	1.50 g	6.10 mmol	1.0 eq
diethylene glycol <b>46</b> [106.12]	3.75 mL	39.5 mmol	6.5 eq
<i>para</i> -toluenesulfonic acid [172.20]	65.0 mg	0.38 mmol	0.06 eq



2-Bromo-5-nitrobenzoic acid **39** (1.50 g, 6.10 mmol) was suspended in diethylene glycol **46** (3.75 mL, 39.5 mmol) and *para*-toluenesulfonic acid (65.0 mg, 0.38 mmol) was added. The mixture was heated to 120 °C for 4 h. After cooling to RT the mixture was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) and washed with sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> (5 mL). The organic layer was washed with H<sub>2</sub>O (5 mL) and brine (5 mL) and dried over MgSO<sub>4</sub>. The solvents were removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc 5:1) to give nitrobenzoate **47** (1.28 g, 3.84 mmol, 63%), as an amorphous light yellow solid.

**TLC:**  $R_f = 0.48$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 10:1).

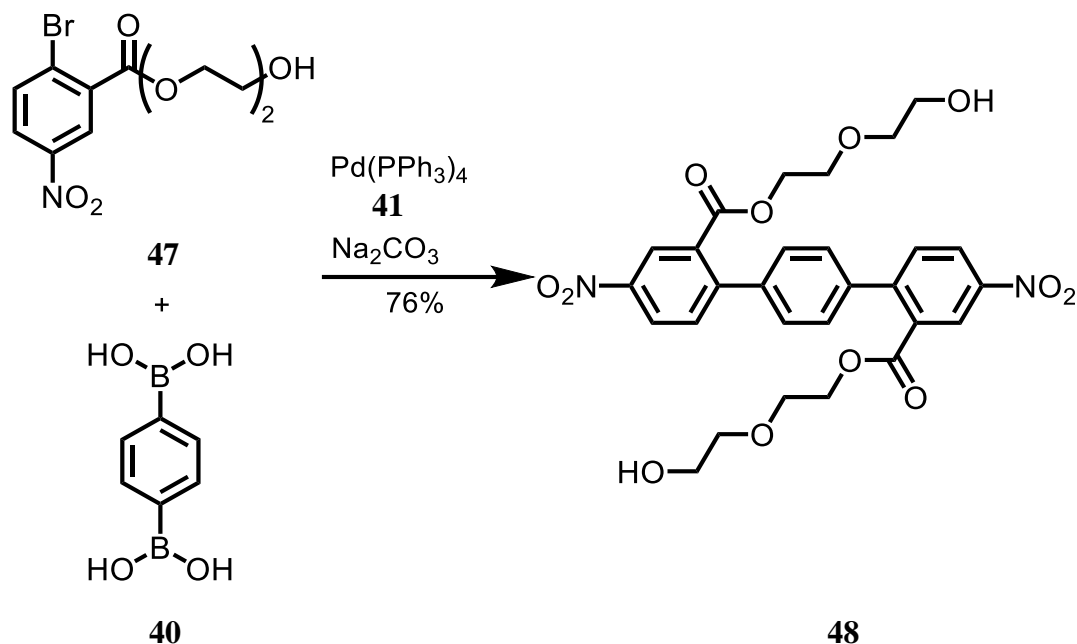
**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 2.12 (s, 1H, OH), 3.65 – 3.68 (m, 2H, HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.77 (s br, 2H, HOCH<sub>2</sub>), 3.86 – 3.89 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>), 4.56 (t,  $J = 4.6$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OOC), 7.86 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H, H<sub>Ar</sub>), 8.16 (dd,  $J = 2.7, 8.8$  Hz, 1H, H<sub>Ar</sub>), 8.64 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H, H<sub>Ar</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 60.9 (HOCH<sub>2</sub>), 65.3 (CH<sub>2</sub>OOC), 68.8 (CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>), 72.5 (HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 126.5 (C<sub>Ar</sub>), 126.8 (C<sub>Ar</sub>), 129.3 (C<sub>q,Ar</sub>), 133.4 (C<sub>q,Ar</sub>), 135.8 (C<sub>Ar</sub>), 146.7 (C<sub>q,Ar</sub>), 164.3 (C=O).

**IR:** (neat): 3436 (m, br), 3101 (w), 2873 (m), 1734 (s), 1606 (m), 1571 (w), 1528 (s), 1458 (m), 1403 (w), 1347 (s), 1300 (m), 1249 (s), 1124 (s), 1068 (m), 1033 (s), 917 (w), 889 (w), 838 (m), 779 (w), 738 (m), 658 (w), 488 (w).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>BrNO<sub>6</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 355.9740; found 355.9739.

#### 6.2.1.4 Bis(2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)-4,4''-dinitroterphenyl-2,2''-dicarboxylester **48**



diboronic acid <b>40</b> [165.75]	74.0 mg	0.45 mmol	1.0 eq
nitrobenzoate <b>47</b> [334.12]	300 mg	0.90 mmol	2.0 eq
1.8 M aq. $\text{Na}_2\text{CO}_3$ [105.99]	1.00 mL	1.80 mmol	4.0 eq
$\text{Pd(PPh}_3)_4$ <b>41</b> [1155.56]	5.00 $\mu\text{g}$	0.05 mmol	0.1 eq

Diboronic acid **40** (74.0 mg, 0.45 mmol) and nitrobenzoate **47** (300 mg, 0.90 mmol) were dissolved in THF (4 mL) and a 1.8 M aq.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  solution (1.00 mL, 1.80 mmol) in degassed water was added. The solution was heated to 60 °C until all compounds were dissolved and  $\text{Pd(PPh}_3)_4$  **41** (5.00  $\mu\text{g}$ , 0.05 mmol) was added. The mixture was heated to reflux and stirred overnight. After cooling to RT the reaction was filtered and the solvents were removed under reduced pressure. The remaining crude product was purified by flash column chromatography on silica gel ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  200:3) to give terphenyl **48** (200 mg, 0.34 mmol, 76%) as an amorphous, pale yellow solid.

**TLC:**  $R_f = 0.43$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  10:1).

**$^1\text{H-NMR}$ :** (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta = 3.36 - 3.40$  (m, 4H, H-10, H-10''), 3.43 – 3.48 (m, 4H, H-11, H-11''), 3.52 – 3.55 (m, 4H, H-9, H-9''), 4.26 – 4.29 (m, 4H, H-8, H-8''), 4.58 (t,  $J = 5.4$  Hz, 2H, 2x OH), 5.52 (s, 4H,

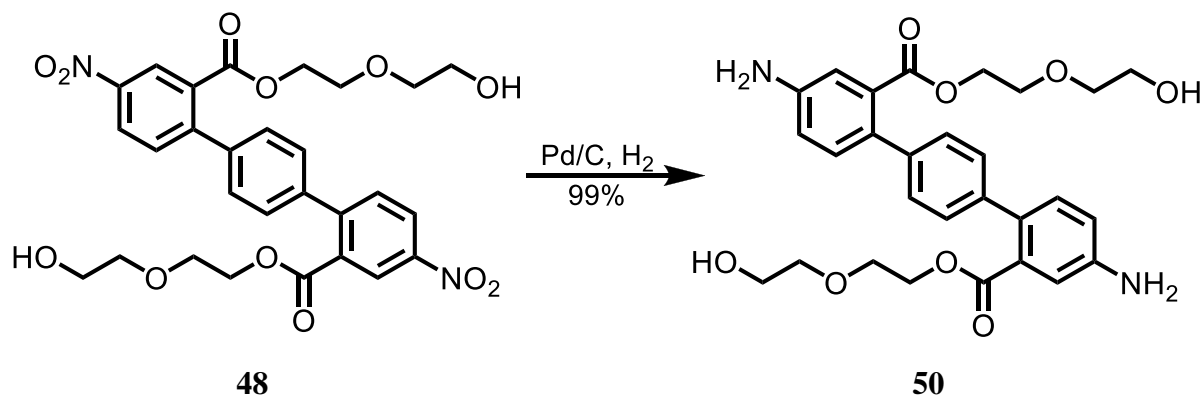
H-2', H-3', H-5', H-6'), 7.81 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-5, H-5''), 8.48 (dd,  $J = 2.5, 8.6$  Hz, 2H, H-6, H-6''), 8.57 (d,  $J = 2.3$  Hz, 2H, H-2, H-2'').

**$^{13}\text{C}$ -NMR:** (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta = 60.1$  (2C, C-11, C-11''), 64.7 (2C, C-8, C-8''), 67.7 (2C, C-9, C-9''), 72.2 (2C, C-10, C-10''), 124.3 (2C, C-5, C-5''), 126.1 (2C, C-2, C-2''), 128.4 (4C, C-2', C-3', C-5', C-6'), 131.9 (2C, C-3, C-3''), 132.3 (2C, C-6, C-6''), 138.6 (2C, C-1', C-4'), 146.6 (2C, C-1, C-1''), 146.7 (2C, C-4, C-4''), 165.9 (2C, C-7, C-7'').

**IR:** (neat): 3359 (m, br), 3171 (w), 2761 (m), 1746 (s), 1598 (m), 1564 (w), 1547 (s), 1499 (w), 1453 (m), 1445 (w), 1357 (s), 1331 (w), 1309 (m), 1270 (m), 1142 (s), 1057 (w), 1044 (s), 981 (w), 864 (w), 847 (m), 762 (w), 701 (m), 624 (w), 499 (w).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_{12}\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 607.1534; found 607.1533.

#### 6.2.1.5 Bis(2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)-4,4''-diaminoterphenyl-2,2''-dicarboxylester **50**



terphenyl <b>48</b> [584.53]	53.0 mg	91.0 $\mu\text{mol}$	1.0 eq
palladium on carbon [10% w/w]	9.70 mg	9.1 $\mu\text{mol}$	0.1 eq

Terphenyl **48** (53.0 mg, 91.0  $\mu\text{mol}$ ) was dissolved in EtOAc (3 mL) and MeOH (1 mL) and palladium on carbon (10% w/w, 9.70 mg, 9.1  $\mu\text{mol}$ ) was added. The solution was flushed with hydrogen and stirred for 24 h. The reaction was filtered over celite and the solvents were

---

removed under reduced pressure to give terphenyl **50** (47 mg, 90  $\mu$ mol, 99%) as an amorphous, colorless solid.

**TLC:**  $R_f$  = 0.31 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub> 10:1:0.1).

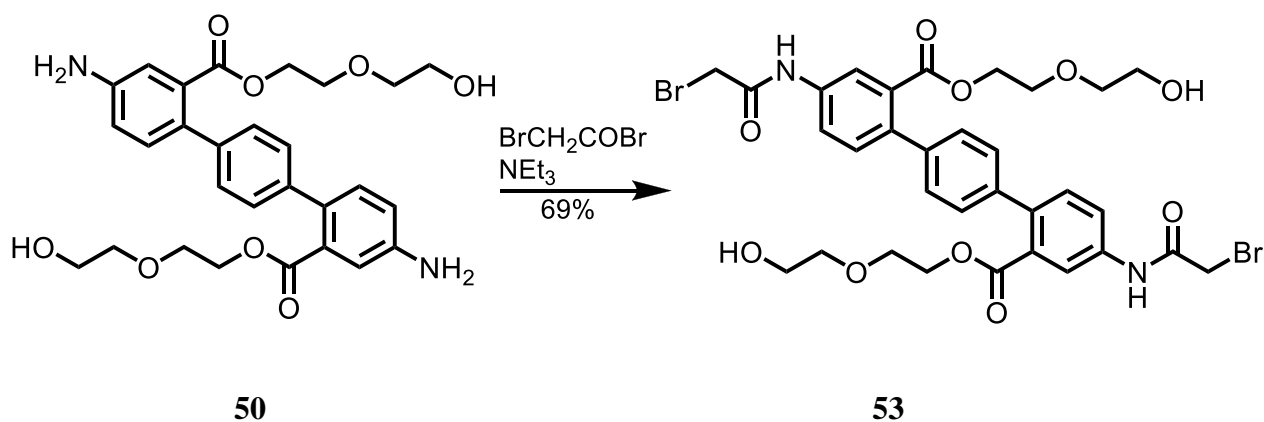
**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, MeCN-*d*<sub>3</sub>)  $\delta$  = 2.68 (t,  $J$  = 5.7 Hz, 2H, 2x OH), 3.40 – 3.43 (m, 4H, H-11, H-11''), 3.49 – 3.54 (m, 8H, H-9, H-9'', H-10, H-10''), 4.17 – 4.20 (m, 4H, H-8, H-8''), 4.41 (s, 4H, 2x NH<sub>2</sub>), 6.84 (dd,  $J$  = 2.5, 8.3 Hz, 2H, H-6, H-6''), 7.00 (d,  $J$  = 2.5 Hz, 2H, H-2, H-2''), 7.18 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H, H-5, H-5''), 7.23 (s, 4H, H-2', H-3', H-5', H-6').

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, MeCN-*d*<sub>3</sub>)  $\delta$  = 60.4 (2C, C-11, C-11''), 64.3 (2C, C-8, C-8''), 67.9 (2C, C-9, C-9''), 71.9 (2C, C-10, C-10''), 124.3 (2C, C-5, C-5''), 126.1 (2C, C-2, C-2''), 128.4 (4C, C-2', C-3', C-5', C-6'), 131.9 (2C, C-3, C-3''), 132.3 (2C, C-6, C-6''), 138.6 (2C, C-1', C-4'), 146.6 (2C, C-1, C-1''), 146.7 (2C, C-4, C-4''), 165.9 (2C, C-7, C-7'').

**IR:** (neat): 3245 (m, br), 3169 (w), 2856 (m), 1689 (s), 1575 (m), 1554 (w), 1540 (s), 1507 (w), 1487 (w), 1461 (w), 1434 (m), 1378 (s), 1341 (w), 1310 (m), 1263 (m), 1180 (s), 1103 (w), 1064 (w), 1038 (s), 960 (w), 874 (w), 841 (m), 750 (w), 734 (m), 620 (w), 454 (w).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 547.2051; found 547.2052.

### 6.2.1.6 Bis(2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)-4,4''-bis(2-bromoacetamido)terphenyl-2,2''-dicarboxylester **53**



terphenyl <b>50</b> [524.56]	30 mg	57.0 $\mu\text{mol}$	1.0 eq
bromoacetyl bromide [201.84; $\rho = 2.32$ ]	20 $\mu\text{L}$	228 $\mu\text{mol}$	4.0 eq
triethylamine [101.19; $\rho = 0.73$ ]	31 $\mu\text{L}$	228 $\mu\text{mol}$	4.0 eq

Terphenyl **50** (30 mg, 57.0  $\mu\text{mol}$ ) was dissolved in  $\text{CHCl}_3$  (4 mL) and triethylamine (31  $\mu\text{L}$ , 228  $\mu\text{mol}$ ) was added. Bromoacetyl bromide (20  $\mu\text{L}$ , 228  $\mu\text{mol}$ ), dissolved in  $\text{CHCl}_3$  (1 mL), was added slowly at 0 °C. The ice bath was removed and stirring was continued at RT for 3.5 h. Without further treatment, the crude product was purified by flash column chromatography on silica gel ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  100:1) to give bromoacetamid **53** (31 mg, 39  $\mu\text{mol}$ , 69%) as an amorphous, light brown solid.

**TLC:**  $R_f = 0.46$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  10:1).

**$^1\text{H-NMR}$ :** (300 MHz,  $\text{MeCN-}d_3$ )  $\delta = 3.42 - 3.44$  (m, 4H, H-11, H-11''), 3.52 – 3.56 (m, 8H, H-10, H-10'', H-9, H-9''), 3.99 (s, 4H, 2x  $\text{CH}_2\text{Br}$ ), 4.22 – 4.25 (m, 4H, H-8, H-8''), 7.33 (s, 4H, H-2', H-3', H-4', H-5'), 7.42 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H, H-5, H-5''), 7.75 (dd,  $J = 1.6, 8.4$  Hz, 2H, H-6, H-6''), 8.04 (d,  $J = 2.0$  Hz, 2H, H-2, H-2'') 8.97 (s, 2H, 2x NH).

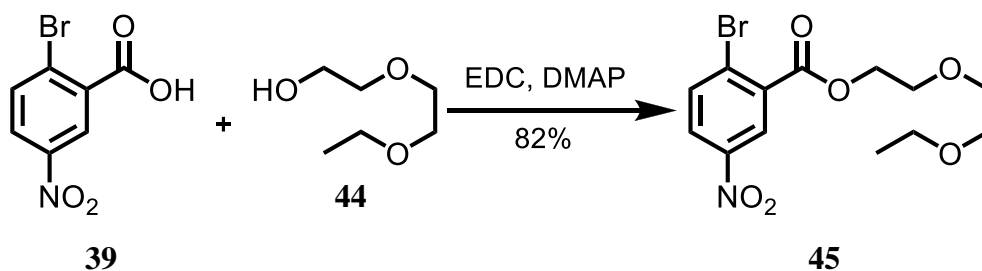
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (75 MHz,  $\text{MeCN-}d_3$ )  $\delta = 27.9$  (2C, 2x $\text{CH}_2\text{Br}$ ), 60.3 (2C, C-11, C-11''), 64.9 (2C, C-8, C-8''), 67.9 (2C, C-9, C-9''), 71.8 (2C, C-10, C-10''), 119.3 (2C, C-5, C-5''), 120.1 (2C, C-2, C-2''), 124.2 (2C, C-6, C-6''),

127.3 (4C, C-2', C-3', C-5', C-6'), 129.5 (2C, C-3, C-3''), 131.5 (2C, C-4, C-4''), 138.5 (2C, C-1', C-4'), 141.2 (2C, C-1, C-1''), 168.7 (2C, C-7, C-7''), 168.9 (2C, 2xNHCO).

**IR:** (neat): 3198 (m, br), 3131 (w), 2965 (m), 1794 (s), 1703 (m), 1694 (m), 1602 (w), 1575 (s), 1512 (m), 1467 (w), 1444 (m), 1421 (w), 1367 (s), 1334 (w), 1300 (m), 1234 (m), 1159 (s), 1128 (w), 1078 (w), 1056 (s), 945 (w), 887 (w), 838 (m), 745 (m), 647 (w), 475 (w).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for  $C_{32}H_{34}Br_2N_2O_{10}Na$   $[M+Na]^+$ : 787.0472; found 787.0478.

#### 6.2.1.7 2-(2-Ethoxyethoxy)ethyl 2-bromo-5-nitrobenzylester **45**<sup>[108]</sup>



2-bromo-5-nitrobenzoic acid <b>39</b> [246.01]	0.50 g	2.03 mmol	1.0 eq
di(ethyleneglycol)ethyl ether <b>44</b> [134.17; $\rho = 1.43$ ]	1.36 mL	10.2 mmol	5.0 eq
EDC [191.70]	0.41 g	2.54 mmol	1.25 eq
4-dimethylaminopyridine [122.17]	0.37 g	3.05 mmol	1.5 eq

2-Bromo-5-nitrobenzoic acid **39** (0.50 g, 2.03 mmol) and di(ethyleneglycol)ethyl ether **44** (1.36 mL, 10.2 mmol) were dispensed in  $CH_2Cl_2$  (10 mL). 4-Dimethylaminopyridine (0.37 g, 3.05 mmol) was added and stirring was continued until all material was dissolved. EDC (0.41 g, 2.54 mmol) was added at RT and the solution was stirred for 6h. The reaction was diluted with 20 mL  $CH_2Cl_2$  and extracted with water (4x 20 mL). The organic layer was washed with sat. aq.  $NaHCO_3$  (20 mL), 1 M aq.  $NaHSO_4$  (20 mL) and brine (20 mL) and

---

dried over  $\text{MgSO}_4$ . The solvent was removed under reduced pressure to give nitrobenzoate **45** (0.60 g, 1.66 mmol, 82%) as an amorphous, colorless solid.

**TLC:**  $R_f = 0.69$  (hexane/EtOAc 1:1).

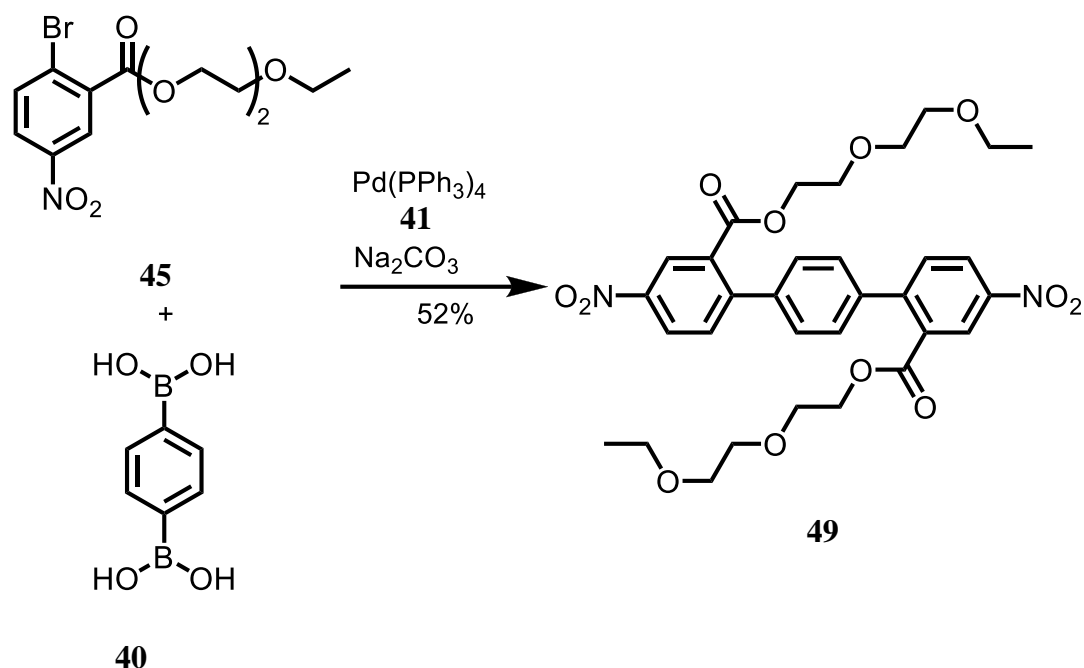
**$^1\text{H-NMR}$ :** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 1.19$  (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H, H-13), 3.52 (q,  $J = 6.9$  Hz, 2H, H-12), 3.60 – 3.62 (m, 2H, H-11), 3.68 – 3.70 (m, 2H, H-10), 3.84 – 3.88 (m, 2H, H-9), 4.53 – 4.56 (m, 2H, H-8), 7.86 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, H-6), 8.16 (dd,  $J = 2.8, 8.8$  Hz, 1H, H-5), 8.65 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H, H-3).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 15.3$  (C-13), 65.5 (C-8), 66.9 (C-12), 68.9 (C-9), 70.0 (C-11), 70.9 (C-10), 126.5 (C-6), 126.7 (C-5), 129.4 (C-1), 133.5 (C-2), 135.8 (C-3), 146.9 (C-4), 164.2 (C-7).

**IR:** (neat): 3101 (w), 2973 (w), 2868 (m), 1736 (s), 1606 (m), 1570 (w), 1528 (s), 1456 (m), 1402 (w), 1346 (s), 1299 (m), 1245 (s), 1108 (s), 1030 (s), 916 (m), 838 (m), 779 (w), 737 (s), 685 (w), 659 (w), 578 (w), 488 (w), 456 (w).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{BrNO}_6\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 384.0053; found 384.0059.

### 6.2.1.8 Bis(2-(2-ethoxyethoxy)ethyl) 4,4''-dinitroterphenyl-2,2''-dicarboxylester **49**



diboronic acid <b>40</b> [165.75]	110 mg	0.65 mmol	1.0 eq
nitrobenzoate <b>45</b> [334.12]	470 mg	1.29 mmol	2.0 eq
2.0 M aq. $\text{Na}_2\text{CO}_3$ [105.99]	1.29 mL	2.58 mmol	4.0 eq
$\text{Pd(PPh}_3)_4$ <b>41</b> [1155.56]	150 mg	0.13 mmol	0.2 eq

Diboronic acid **40** (110 mg, 1.0 mmol) and nitrobenzoate **45** (470 mg, 1.29 mmol) were dissolved in THF (5 mL) and a 2.0 M aq.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  solution (1.29 mL, 2.58 mmol) in degassed water was added. The solution was heated to 60 °C until all compounds were dissolved and  $\text{Pd(PPh}_3)_4$  **41** (150 mg, 0.13 mmol) was added. The mixture was heated to reflux and stirred overnight. After cooling down to RT the reaction was filtered and the solvents were removed under reduced pressure. The remaining crude product was purified by flash column chromatography on silica gel ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  100:1) to give terphenyl **49** (217 mg, 0.34 mmol, 52%) as an amorphous, pale yellow solid.

**TLC:**  $R_f$  = 0.38 (hexane/EtOAc 1:1).

**$^1\text{H-NMR}$ :** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 1.17 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 6H, H-13, H-13''), 3.50 (q,  $J$  = 7.0 Hz, 4H, H-12, H-12''), 3.54 – 3.62 (m, 8H, H-10, H-10'', H-11,



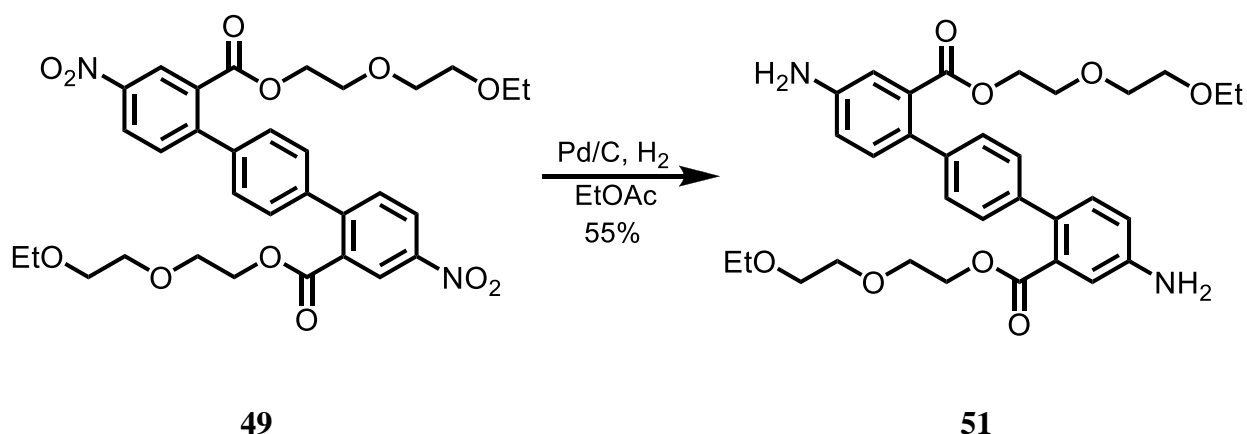
H-11''), 3.63 – 3.66 (m, 4H, H-9, H-9''), 4.32 – 4.36 (m, 4H, H-8, H-8''), 7.42 (s, 4H, H-2', H-3', H-5', H-6'), 7.62 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-5, H-5''), 8.40 (dd,  $J = 2.4, 8.5$  Hz, 2H, H-6, H-6''), 8.74 (d,  $J = 2.4$  Hz, 2H, H-2, H-2'').

**$^{13}\text{C}$ -NMR:** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 15.3$  (2C, C-13, C-13''), 65.0 (2C, C-8, C-8''), 66.8 (2C, C-12, C-12''), 68.8 (2C, C-9, C-9''), 69.9 (2C, C-11, C-11''), 70.8 (2C, C-10, C-10''), 125.5 (2C, C-2, C-2''), 126.0 (2C, C-6, C-6''), 128.5 (4C, C-2', C-3', C-5', C-6'), 132.2 (2C, C-5, C-5''), 132.3 (2C, C-3, C-3''), 139.5 (2C, C-1', C-4'), 147.1 (2C, C-4, C-4''), 148.1 (2C, C-1, C-1''), 166.2 (2C, C-7, C-7'').

**IR:** (neat): 3187 (m, br), 3003 (w), 2821 (m), 1812 (s), 1645 (m), 1547 (w), 1501 (s), 1474 (m), 1432 (w), 1381 (s), 1320 (m), 1278 (s), 1132 (s), 1010 (s), 959 (m), 831 (m), 742 (w), 723 (s), 667 (w), 636 (w), 545 (w), 477 (w), 439 (w).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 747.3827; found 747.3814

#### 6.2.1.9 Bis(2-(2-ethoxyethoxy)ethyl) 4,4''-diaminoterphenyl-2,2''-dicarboxylester **51**



terphenyl <b>49</b> [640.63]	50.0 mg	78.0 $\mu\text{mol}$	1.0 eq
palladium on carbon [10% w/w]	8.30 mg	7.80 $\mu\text{mol}$	0.1 eq

---

Terphenyl **49** (50.0 mg, 78.0  $\mu\text{mol}$ ) was dissolved in EtOAc (3 mL) and MeOH (1 mL) and palladium on carbon (10% w/w, 8.30 mg, 7.80  $\mu\text{mol}$ ) was added. The solution was flushed with hydrogen and stirred overnight. The reaction was filtered over celite and the solvents were removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (EtOAc/pentane/ $\text{NH}_3$  7:3:0.1) to give terphenyl **51** (25 mg, 43  $\mu\text{mol}$ , 55%) as an amorphous, colorless solid.

**TLC:**  $R_f$  = 0.34 (EtOAc/hexane/ $\text{NH}_3$  5:5:0.1).

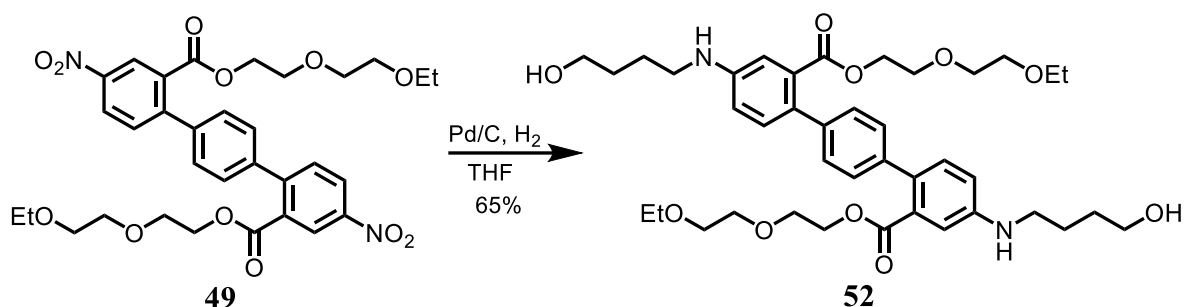
**$^1\text{H}$ -NMR:** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 1.17 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 6H, H-13, H-13''), 3.48 (q,  $J$  = 7.8 Hz, 4H, H-12, H-12''), 3.50 (s, 12H, H-9, H-9'', H-10, H-10'', H-11, H-11''), 3.79 (s, 4H, 2x  $\text{NH}_2$ ), 4.22 (t,  $J$  = 5.0 Hz, 4H, H-8), 6.83 (dd,  $J$  = 2.5, 8.2 Hz, 2H, H-6, H-6''), 7.13 (d,  $J$  = 2.5 Hz, 2H, H-2, H-2''), 7.20 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H, H-5, H-5''), 7.25 (s, 4H, H-2', H-3', H-5', H-6').

**$^{13}\text{C}$ -NMR:** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 15.3 (2C, C-13, C-13''), 64.2 (2C, C-8, C-8''), 66.8 (2C, C-12, C-12''), 68.9 (2C, C-9, C-9''), 69.9 (2C, C-11, C-11''), 70.7 (2C, C-10, C-10''), 116.2 (2C, C-2, C-2''), 117.8 (2C, C-6, C-6''), 128.3 (4C, C-2', C-3', C-5', C-6'), 131.8 (2C, C-4, C-4''), 131.9 (2C, C-5, C-5''), 132.6 (2C, C-3, C-3''), 139.9 (2C, C-1, C-1''), 145.6 (2C, C-1', C-4''), 168.9 (2C, C-7, C-7'').

**IR:** (neat): 3112 (m, br), 3075 (w), 2876 (m), 1845 (s), 1714 (m), 1678 (w), 1574 (w), 1524 (s), 1468 (m), 1421 (w), 1368 (s), 1342 (m), 1225 (s), 1167 (s), 1103 (s), 1021 (w), 972 (m), 814 (m), 775 (w), 728 (s), 689 (w), 645 (w), 574 (w), 499 (w), 425 (w).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 603.2682; found 603.2687.

### 6.2.1.10 Bis(2-(2-ethoxyethoxy)ethyl)-4,4''-bis((4-hydroxybutyl)amino)-[1,1':4',1''-terphenyl]-2,2''-dicarboxylester **52**



terphenyl <b>49</b> [640.63]	100 mg	156 $\mu\text{mol}$	1.0 eq
palladium on carbon [10% w/w]	16.6 mg	15.6 $\mu\text{mol}$	0.1 eq

Terphenyl **49** (100 mg, 156  $\mu\text{mol}$ ) was dissolved in THF (10 mL) and MeOH (1 mL) and palladium on carbon (10% w/w, 16.6 mg, 15.6  $\mu\text{mol}$ ) was added. The solution was flushed with hydrogen and stirred for 6h at RT. The reaction was filtered over celite and the solvents were removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (EtOAc/pentane/ $\text{NH}_3$  5:5:0.1) to give terphenyl **52** (74 mg, 101  $\mu\text{mol}$ , 65%) as an amorphous, colorless solid.

**TLC:**  $R_f = 0.42$  (EtOAc/hexane/ $\text{NH}_3$  5:5:0.1).

**$^1\text{H-NMR}$ :** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 1.15$  (t,  $J = 7.0$  Hz, 6H, H-13, H-13''), 1.65 – 1.72 (m, 8H, H-15, H-15'', H-16, H-16''), 3.19 (t,  $J = 6.6$  Hz, 4H, H-14, H-14''), 3.43 – 3.49 (m, 16H, H-9, H-9'', H-10, H-10'', H-11, H-11'', H-12, H-12''), 3.67 (t,  $J = 6.0$  Hz, 4H, H-17, H-17''), 4.21 (t,  $J = 5.0$  Hz, 4H, H-8, H-8''), 6.73 (dd,  $J = 2.5, 8.4$  Hz, 2H, H-6, H-6''), 7.01 (d,  $J = 2.5$  Hz, 2H, H-2, H-2''), 7.19 (d,  $J = 8.36$  Hz, 2H, H-5, H-5''), 7.23 (s, 4H, H-2', H-3', H-5', H-6').

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 15.2$  (2C, C-13, C-13''), 26.0 (2C, C-16, C-16''), 30.3 (2C, C-15, C-15''), 43.8 (2C, C-14, C-14''), 62.5 (2C, C-17, C-17''), 64.2 (2C, C-8, C-8''), 66.7 (2C, C-12, C-12''), 68.8 (2C, C-9, C-9''), 69.8 (2C, C-10, C-10''), 70.6 (2C, C-11, C-11''), 113.6 (2C, C-2,

**IR:** (neat): 3073 (m, br), 3024 (w), 2912 (m), 1920 (s), 1799 (m), 1702 (w), 1642 (w), 1587 (w), 1534 (s), 1474 (m), 1419 (w), 1377 (s), 1334 (m), 1248 (s), 1181 (s), 1114 (s), 1054 (w), 967 (m), 824 (m), 784 (w), 732 (s), 691 (w), 634 (w), 564 (w), 488 (w), 434 (w).

#### 6.2.1.11 Bis(2-(2-ethoxyethoxy)ethyl) 4,4''-diaminoterphenyl-2,2''-dicarboxylester 54



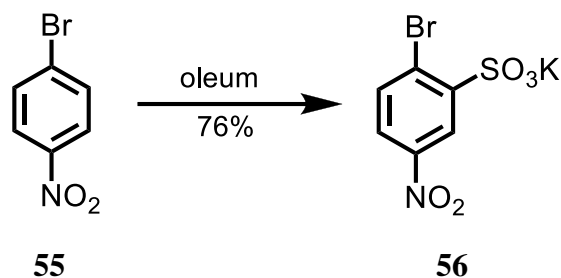
- 116 -

---

<b>TLC:</b>	$R_f = 0.55$ ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10:1).
<b><math>^1\text{H-NMR}</math>:</b>	(300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) $\delta = 1.03$ (t, $J = 7.0$ Hz, 6H, H-13, H-13''), 3.32 – 3.48 (m, 16H, H-9, H-9'', H-10, H-10'', H-11, H-11'', H-12, H-12''), 4.08 (s, 4H, 2x $\text{CH}_2\text{Br}$ ), 4.17 – 4.20 (m, 4H, H-8, H-8''), 7.32 (s, 4H, H-2', H-3', H-4', H-5'), 7.47 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-5, H-5''), 7.82 (dd, $J = 2.3, 8.5$ Hz, 2H, H-6, H-6''), 8.03 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H, H-2, H-2''), 10.70 (s, 2H, 2x NH).
<b><math>^{13}\text{C-NMR}</math>:</b>	(75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) $\delta = 15.0$ (2C, C-13, C-13''), 61.9 (2C, 2x $\text{CH}_2\text{Br}$ ), 64.0 (2C, C-8, C-8''), 65.5 (2C, C-12, C-12''), 67.9 (2C, C-9, C-9''), 69.1 (2C, C-11, C-11''), 69.7 (2C, C-10, C-10''), 120.1 (2C, C-5, C-5''), 122.3 (2C, C-2, C-2''), 128.0 (4C, C-2', C-3', C-5', C-6'), 130.8 (2C, C-6, C-6''), 131.1 (2C, C-4, C-4''), 135.6 (2C, C-3, C-3''), 137.8 (2C, C-1', C-4'), 138.9 (2C, C-1, C-1''), 167.9 (2C, C-7, C-7''), 171.3 (2C, 2x CON).
<b>IR:</b>	(neat): 3325 (m), 3033 (w), 2974 (w), 2871 (m), 1708 (s), 1585 (m), 1532 (m), 1480 (8m), 1417 (m), 1352 (w), 1317 (m), 1294 (m), 1272 (w), 1234 (s), 1193 (m), 1090 (s), 1031 (s), 960 (m), 914 (w), 868 (m), 823 (s), 782 (m), 728 (m), 664 (w), 605 (w), 564 (w), 533 (s), 494 (w), 437 (m).
<b>HRMS (ESI):</b>	$m/z$ calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{42}\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_{10}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 843.1098; found 843.1106.

---

#### 6.2.1.12 Potassium 2-bromo-5-(nitrooxy)benzenesulfonate **56**<sup>[91]</sup>



1-bromo-4-nitrobenzene <b>55</b> [202.01]	2.00 g	9.90 mmol	1.0 eq
oleum [178.14; $\rho = 1.84$ ]	8.00 mL	82.8 mmol	4.2 eq

1-Bromo-4-nitrobenzene **55** (2.00 g, 9.90 mmol) was suspended in oleum (8.00 mL, 82.8 mmol) and heated to 90 °C for 16 h. The solution was poured into a mixture of ice (50 g), water (30 mL) and potassium chlorid (20 g) and stirred for 30 min. The resulting suspension was filtered through a medium porose frit and the solid was washed with THF (2x 10 mL) and Et<sub>2</sub>O (10 mL). The crude product was recrystallized from water to give sulfonate **56** (2.53 g, 7.53 mmol, 76%) as a black-brown solid.

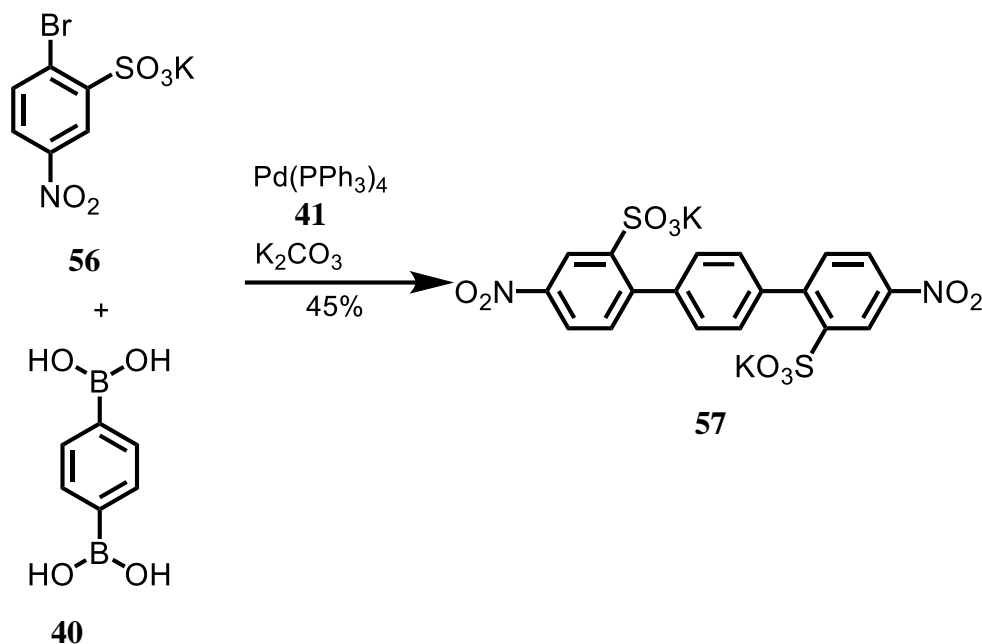
**m.p.:** >300 °C (H<sub>2</sub>O).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 7.90 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, H-6), 8.06 (dd,  $J$  = 2.9, 8.6 Hz, 1H, H-5), 8.63 (d,  $J$  = 2.9 Hz, 1H, H-3).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 123.3 (C-3), 124.5 (C-5), 127.3 (C-1), 135.5 (C-6), 146.1 (C-2), 148.3 (C-4).

**IR:** (neat): 3102 (w), 1596 (w), 1567 (w), 1523 (m), 1444 (w), 1382 (w), 1346 (m), 1295 (w), 1263 (w), 1238 (s), 1200 (s), 1144 (m), 1094 (w), 1053 (s), 1009 (s), 912 (w), 881 (m), 830 (m), 769 (w), 734 (m), 674 (s), 605 (s), 572 (s), 533 (w), 497 (s), 440 (w), 406 (m).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>BrNO<sub>5</sub>S [M-K]<sup>+</sup>: 279.8921; found 279.8922.

6.2.1.13 Potassium 4,4'-dinitrobiphenyl-2,2'-disulfonate **57**

sulfonate <b>56</b> [320.16]	200 mg	0.63 mmol	2.0 eq
diboronic acid <b>40</b> [165.75]	51.8 mg	0.31 mmol	1.0 eq
potassium carbonate [138.21]	173 mg	12.5 mmol	4.0 eq
$\text{Pd(PPh}_3)_4$ <b>41</b> [1155.56]	36 mg	0.03 mmol	0.1 eq

Sulfonate **56** (200 mg, 0.63 mmol), diboronic acid **40** (51.8 mg, 0.31 mmol) and potassium carbonate (173 mg, 12.5 mmol) was suspended in degassed  $\text{H}_2\text{O}$  (3 mL) and absolute THF (3 mL) was added. The solution was gently heated to 50 °C until all material was dissolved.  $\text{Pd(PPh}_3)_4$  **41** (36 mg, 0.03 mmol) was added and the black mixture was heated to reflux and stirred for 24 h. The reaction was cooled down to RT and filtered through a medium porose frit. The remaining residue was washed with  $\text{H}_2\text{O}$ , THF and  $\text{Et}_2\text{O}$  to give analytical pure terphenyl **57** (77.6 mg, 0.14 mmol, 45%) as a grey solid.

**m.p.:** >300 °C ( $\text{Et}_2\text{O}$ ).

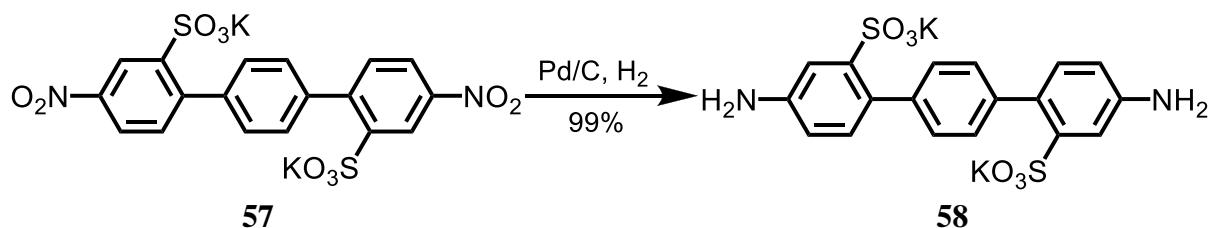
**$^1\text{H-NMR}$ :** (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  = 7.52 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H, H-3, H-3''), 7.65 (s, 4H, H-2', H-3', H-5', H-6'), 8.26 (dd,  $J$  = 2.5, 8.2 Hz, 2H, H-4, H-4''), 8.77 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 2H, H-6, H-6'').

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 122.7 (2C, C-6, C-6''), 123.4 (2C, C-4, C-4''), 128.3 (4C, C-2', C-3', C-5', C-6'), 133.2 (2C, C-3, C-3''), 139.2 (2C, C-1', C-4'), 145.6 (2C, C-1, C-1''), 145.8 (2C, C-2, C-2''), 147.0 (2C, C-5, C-5').

**IR:** (neat): 3641 (w), 3511 (w br), 3098 (w), 1630 (w), 1580 (w), 1517 (s), 1463 (w), 1349 (s), 1303 (w), 1213 (s), 1144 (m), 1079 (s), 1038 (s), 1002 (m), 912 (w), 884 (m), 857 (w), 832 (w), 776 (w), 739 (s), 683 (w), 661 (m), 624 (s), 596 (s), 573 (w), 520 (m), 478 (w), 402 (w).

**HRMS (ESI):** *m/z* calcd for C<sub>18</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>S<sub>2</sub>Na<sub>3</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 546.9464; found 546.9453.

#### 6.2.1.14 Potassium 4,4''-diaminoterphenyl-2,2''-disulfonate **58**



terphenyl <b>57</b> [556.61]	45.7 mg	82.0 $\mu$ mol	1.0 eq
palladium on carbon [10% w/w]	7.90 mg	8.20 $\mu$ mol	0.1 eq

Terphenyl **57** (45.7 mg, 82.0  $\mu$ mol) was dissolved in DMF (5 mL) and MeOH (0.5 mL) and palladium on carbon (10% w/w, 7.90 mg, 8.20  $\mu$ mol) was added. The mixture was flushed with hydrogen and stirred at RT for 90 min. The suspension was filtered through a short plug of celite, which was washed with DMF (5 mL). The filtrate was concentrated to dryness under reduced pressure to give aminoterphenyl **58** (40.4 mg, 81  $\mu$ mol, 99%) as a white solid.

**TLC:**  $R_f$  = 0.63 (RP, H<sub>2</sub>O).

**m.p.:** >300 °C (DMF).

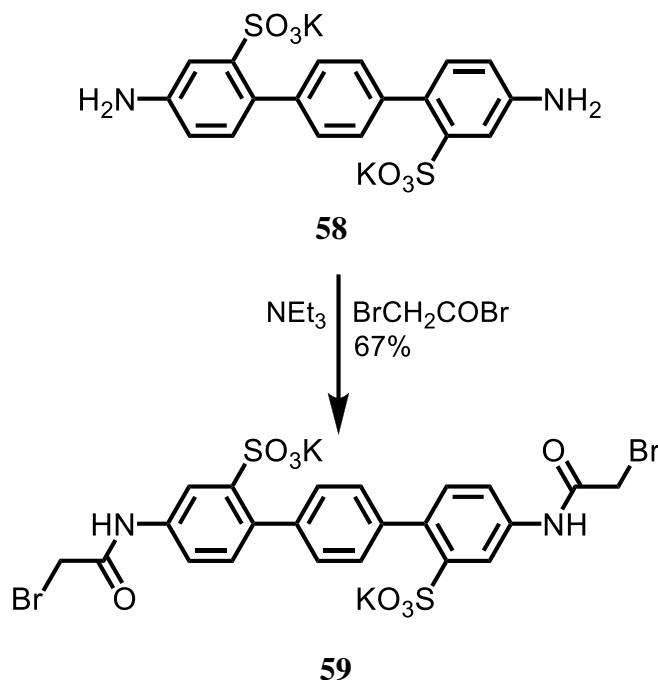


---

<b><math>^1\text{H}</math>-NMR:</b>	(300 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$ = 5.23 (s, 4H, 2xNH <sub>2</sub> ) 6.55 (dd, $J$ = 2.34, 8.1 Hz, 2H, H-4, H-4''), 6.80 (d, $J$ = 8.1 Hz, H, H-3, H-3''), 7.25 (d, $J$ = 2.3 Hz, 2H, H-6, H-6''), 7.34 (s, 4H, H-2', H-3', H-5', H-6').
<b><math>^{13}\text{C}</math>-NMR:</b>	(75 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$ = 113.3 (C-6, C-6''), 113.8 (C-4, C-4''), 126.7 (C-2, C-2''), 128.4 (C-2', C-3', C-5', C-6'), 131.9 (C-3, C-3''), 140.2 (C-1', C-4'), 145.4 (C-1, C-1''), 147.2 (C-5, C-5'').
<b>IR:</b>	(neat): 3604 (w), 3367 (w), 1610 (m), 1523 (w), 1475 (m), 1422 (w), 1296 (w), 1187 (s), 1147 (w), 1088 (s), 1032 (s), 996 (m), 892 (w), 823 (m), 737 (w), 706 (m), 630 (s), 588 (m), 541 (m), 435 (w).
<b>HRMS (ESI):</b>	$m/z$ calcd for C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub> Na <sub>1</sub> [M-Na] <sup>-</sup> : 441.0196; found 441.0186.

---

#### 6.2.1.15 Potassium 4,4''-bis(2-bromoacetamido)terphenyl-2,2''-disulfonate **59**



aminoterphenyl <b>58</b> [496.64]	50.0 mg	101 $\mu$ mol	1.0 eq
bromoacetyl bromide[201.84; $\rho$ = 2.32]	17.5 $\mu$ L	201 $\mu$ mol	2.0 eq

Aminoterphenyl **58** (50.0 mg, 101  $\mu$ mol) was dissolved in DMF (5 mL) and the solution was cooled down to -78 °C. Bromoacetyl bromide (17.5  $\mu$ L, 201  $\mu$ mol) was added slowly and stirring was continued for 10 min. The mixture was allowed to warm up to RT and stirred for 1 h. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting solid was washed with EtOH (2x 5 mL) and Et<sub>2</sub>O (5 mL) to give bromoacetamid **59** (50 mg, 68  $\mu$ mol, 67%) as a brown solid.

**TLC:**  $R_f$  = 0.95 (H<sub>2</sub>O/MeCN 2:1).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 4.06 (s, 4H, 2xCH<sub>2</sub>) 7.15 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H, H-3, H-3''), 7.47 (s, 4H, H-2', H-3', H-5', H-6'), 7.82 (dd,  $J$  = 2.2, 8.3 Hz, 2H, H-4, H-4''), 8.07 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 2H, H-6, H-6''), 10.58 (s, 2H, 2xNH).

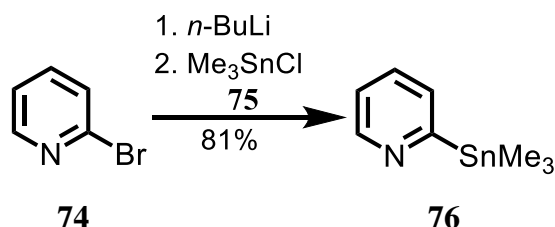
**$^{13}\text{C}$ -NMR:** (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  = 30.4 (2C,  $\text{CH}_2$ ), 118.7 (2C, C-6, C-6''), 119.3 (2C, C-4, C-4''), 128.3 (4C, C-2', C-3', C-5', C-5''), 132.0 (2C, C-3, C-3''), 134.7 (2C, C-2, C-2''), 137.0 (2C, C-1', C-4'), 139.8 (2C, C-5, C-5''), 145.6 (2C, C-1, C-1''), 164.9 (2C, C=O).

**IR:** (neat): 3254 (w), 3032 (w), 1674 (m), 1593 (m), 1523 (m), 1472 (m), 1388 (w), 1318 (w), 1182 (s), 1087 (s), 1033 (s), 998 (m), 896 (w), 827 (m), 774 (w), 718 (w), 680 (w), 625 (s), 591 (m), 534 (s), 484 (w), 443 (w).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2\text{H}_1$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 660.8779; found 660.8782.

## 6.2.2 Synthese der Bipyridine

### 6.2.2.1 2-(Trimethylstannyl)pyridine **76**



2-bromo-pyridine <b>74</b> [158.00]	7.92 g	50 mmol	1.0 eq
<i>n</i> -BuLi [2 M in hexane]	20 mL	50 mmol	1.0 eq
trimethyltin chloride <b>75</b> [199.27]	10.9 g	54 mmol	0.1 eq

A solution of *n*-BuLi (2 M in hexane, 20 mL, 50 mmol) was added to  $\text{Et}_2\text{O}$  (25 mL) and cooled down to  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ . To this mixture a solution of 2-bromo-pyridine **74** (7.92 g, 50 mmol) in  $\text{Et}_2\text{O}$  (50 mL) was added slowly at  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  and stirring was continued for 1 h. Trimethyltin chloride **75** (10.9 g, 54 mmol) in 10 mL  $\text{Et}_2\text{O}$  was added dropwise and the mixture was allowed to warm up to RT. After 10 min the reaction was quenched with sat. aq. ammonium chloride solution, the organic layer was washed with water (50 mL), brine (50 mL) and dried

over MgSO<sub>4</sub>. The solvents were evaporated and the crude product was purified by vacuum distillation (64 °C, 4.8 mbar) to give stannan **76** (9.76 g, 40 mmol, 81%) as a colorless liquid.

**TLC:**  $R_f$  = 0.68 (pentane/Et<sub>2</sub>O 2:1).

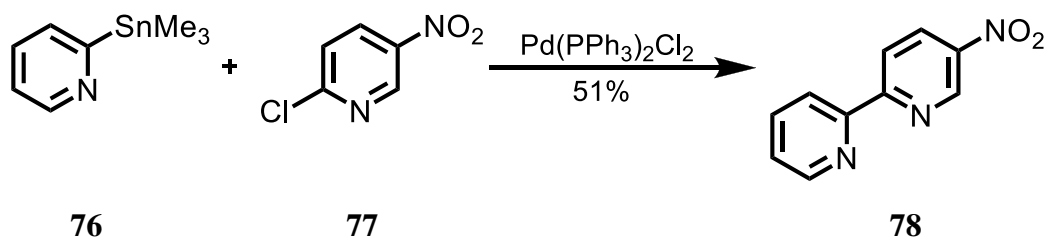
**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 0.34 (s, 9H, Sn(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 7.12 – 7.15 (m, 1H, H-3), 7.43 – 7.55 (m, 2H, H-4, H-5), 8.73 – 8.74 (m, 1H, H-6).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = -9.5 (3C, Sn(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 122.2 (C-5), 131.6 (C-3), 133.5 (C-4), 150.5 (C-6), 173.5 (C-2).

**IR:** (neat): 3055 (w), 2979 (m), 2913 (w), 1563 (m), 1449 (m), 1415 (m), 1266 (w), 1189 (w), 1150 (w), 1042 (w), 987 (w), 769 (s), 754 (s), 712 (m), 616 (w), 530 (s), 440 (m).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>NSnNa [M+Na]<sup>+</sup>: 265.9968; found 265.9971.

#### 6.2.2.2 5-Nitro-2,2'-bipyridine **78**



2-(trimethylstannyl)pyridine <b>76</b> [241.91]	1.68 g	6.94 mmol	1.1 eq
2-chloro-5-nitropyridine <b>77</b> [158.54]	1.00 g	6.31 mmol	1.0 eq
Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> [701.90]	0.25 g	0.34 mmol	0.05 eq

A solution of 2-(trimethylstannyl)pyridine **76** (1.68 g, 6.94 mmol), 2-chloro-5-nitropyridine **77** (1.00 g, 6.31 mmol) and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.25 g, 0.34 mmol) was refluxed for 48 h under argon. The reaction was cooled down to RT and filtered over a short plug of celite eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The solvent was evaporated and the crude product was purified by flash

column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc 3:1) to give bipyridine **78** (0.65 g, 3.22 mmol, 51%) as a yellow solid.

**TLC:**  $R_f = 0.67$  (EtOAc/hexane 1:1).

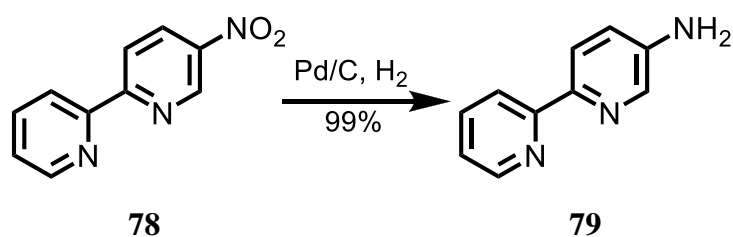
**m.p.:** 180 °C (hexane/EtOAc).

**$^1\text{H-NMR}$ :** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 7.42$  (ddd,  $J = 1.2, 4.8, 7.6$  Hz, 1H, H-5'), 7.89 (ddd,  $J = 1.8, 7.8, 7.8$  Hz, 1H, H-4'), 8.53 (td,  $J = 1.0, 8.0$  Hz, 1H, H-3'), 8.59 (dd,  $J = 2.6, 8.8$  Hz, 1H, H-3), 8.67 (dd,  $J = 0.7, 8.8$  Hz, 1H, H-4), 8.74 (qd,  $J = 0.9, 4.8$  Hz, 1H, H-6'), 9.49 (dd,  $J = 0.6, 2.6$  Hz, 1H, H-6).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 121.3$  (C-3'), 122.6 (C-5'), 125.3 (C-3), 132.2 (C-4), 137.5 (C-4'), 144.2 (C-5), 144.9 (C-6), 149.7 (C-6'), 154.0 (C-2'), 161.0 (C-2).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2\text{Na}_1$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 224.0436; found 224.0439.

### 6.2.2.3 2,2'-Bipyridine-5-amine **79**



5-nitro-2,2'-bipyridine <b>78</b> [241.91]	315 mg	1.56 mmol	1.0 eq
palladium on carbon [10% w/w]	181 mg	0.17 mmol	0.1 eq

To a solution of 5-nitro-2,2'-bipyridine **78** (315 mg, 1.56 mmol) in MeOH (10 mL) was added palladium on carbon (10% w/w, 181 mg, 0.17 mmol) and a drop of acetic acid. The suspension was flushed with hydrogen, stirred for 5 h and filtered over celite. The filtrate was

---

concentrated under reduced pressure to give bipyridine **79** (264 mg, 1.54 mmol, 99%) as a colorless oil.

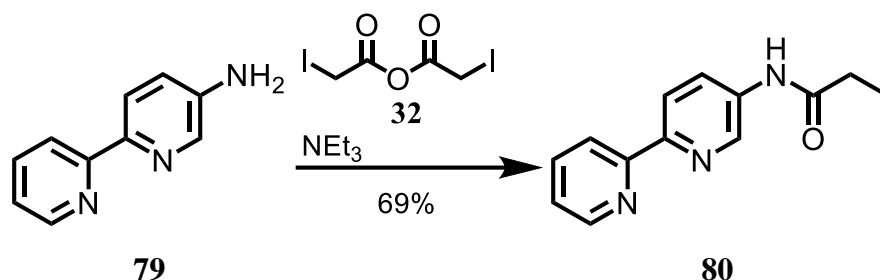
**TLC:**  $R_f = 0.42$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub> 10:1:0.1).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 3.86$  (s br, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.09 (dd,  $J = 2.8, 8.5$  Hz, 1H, H-4), 7.20 (ddd,  $J = 1.2, 4.8, 7.4$  Hz, 1H, H-5'), 7.74 (ddd,  $J = 1.9, 7.6, 8.0$  Hz, 1H, H-4'), 8.15 (dd,  $J = 0.8, 2.8$  Hz, 1H, H-6), 8.19 (dd,  $J = 1.0, 8.5$  Hz, 1H, H-3), 8.24 (td,  $J = 1.1, 8.1$  Hz, 1H, H-6'), 8.61 (qd,  $J = 0.9, 4.8$  Hz, 1H, H-3').

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 120.1$  (C-3'), 121.8 (C-4), 122.2 (C-5'), 122.6 (C-3), 136.7 (C-6), 136.8 (C-4'), 142.9 (C-5), 147.2 (C-2), 149.1 (C-6'), 156.6 (C-2').

**IR:** (neat): 3327 (s), 3198 (s), 3050 (w), 3007 (w), 1640 (m), 1589 (s), 1498 (w), 1461 (s), 1438 (w), 1412 (m), 1323 (m), 1281 (m), 1246 (w), 1141 (w), 844 (w), 792 (m), 744 (s), 648 (w), 583 (m), 410 (w).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>H<sub>1</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 172.0875; found 172.0871

6.2.2.4 *N*-(2,2'-Bipyridin-5-yl)-2-iodoacetamide **80**

2,2'-bipyridine-5-amine <b>79</b> [339.13]	100 mg	0.58 mmol	1.0 eq
2-iodoacetic anhydride <b>32</b> [353.88]	246 mg	0.70 mmol	1.2 eq
triethylamine [101.19; $\rho = 0.73$ ]	90 $\mu\text{L}$	0.64 mmol	1.1 eq

To a solution of amine **79** (100 mg, 0.58 mmol) and triethylamine (0.09 mL, 0.64 mmol) in  $\text{CHCl}_3$  (6 mL) was added 2-iodoacetic anhydride **32** (246 mg, 0.70 mmol) at 0 °C and the reaction was stirred for 2.5 h at RT. Without further treatment, the crude product was purified by flash column chromatography on deactivated silica gel ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$  100:2:1) to give iodoacetamide **80** (138 mg, 40  $\mu\text{mol}$ , 69%) as a light yellow solid.

**TLC:**  $R_f = 0.45$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$  10:1:0.1).

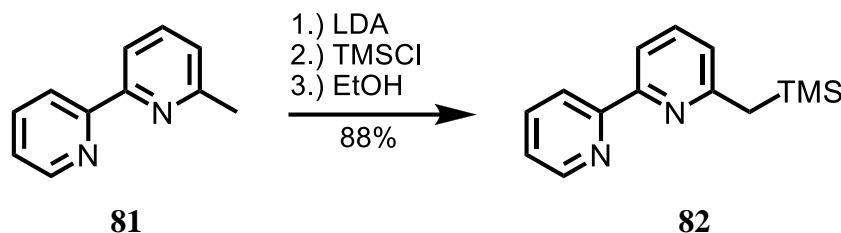
**$^1\text{H}$ -NMR:** (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta = 3.88$  (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{I}$ ), 7.42 (ddd,  $J = 1.2, 4.8, 7.5$  Hz, 1H, H-5'), 7.92 (dt,  $J = 1.8, 11.6$  Hz, 1H, H-4'), 8.18 – 8.22 (m, 1H, H-4), 8.31 – 8.40 (m, 2H, H-6, H-6'), 8.64 – 8.67 (m, 1H, H-3), 8.80 – 8.81 (m, 1H, H-3'), 10.74 (s, 1H, NH).

**$^{13}\text{C}$ -NMR:** (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta = 0.9$  ( $\text{CH}_2\text{I}$ ), 120.0 (C-3'), 120.7 (C-5'), 123.7 (C-3), 126.8 (C-4), 136.0 (C-4'), 137.4 (C-6), 139.9 (C-5), 149.0 (C-6'), 150.1 (C-2), 154.7 (C-2'), 167.3 (C=O).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{IN}_3\text{ONa}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 361.9766; found 361.9764.

---

#### 6.2.2.5 6-((Trimethylsilyl)methyl)-2,2'-bipyridine **82**



6-methyl-2,2'-bipyridine <b>81</b> [241.91]	200 mg	1.18 mmol	1.0 eq
diisopropylamine [101.19; $\rho = 0.72$ ]	0.21 mL	1.47 mmol	1.25 eq
<i>n</i> -butyllithium [2.5 M in hexane]	0.65 mL	1.29 mmol	1.1 eq
trimethylsilyl chloride [108.64; $\rho = 0.856$ ]	0.17 mL	1.47 mmol	1.25 eq

A solution of diisopropylamine (0.21 mL, 1.47 mmol) in THF (2 mL) was cooled down to -78 °C and *n*-butyllithium (2.5 M in hexane, 0.65 mL, 1.29 mmol) was added. The solution was stirred at -78 °C for 10 min, warmed up to 0 °C and stirred for 10 min. The mixture was cooled down to -78 °C and a solution of 6-methyl-2,2'-bipyridine (**81**) (200 mg, 1.18 mmol) in THF (3 mL) was added dropwise. The resulting black mixture was stirred for 1 h at -78 °C and trimethylsilyl chloride (0.17 mL, 1.47 mmol) was added. The solution was stirred for exactly 8 seconds and ethanol (0.3 mL) was added rapidly. The cold solution was poured into sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> (5 mL) and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x 6 mL). The combined organic layers were washed with brine (5 mL) and dried over MgSO<sub>4</sub>. The solvent was removed under reduced pressure and the crude solid was purified by flash column chromatography on deactivated silica gel (hexane/MTBE/NH<sub>3</sub> 6:1:0.07) to give silane **82** (253 mg, 1.04 mmol, 88%) as a colorless foam.

**TLC:**  $R_f = 0.29$  (hexane/MTBE 5:1).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 0.00 (s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.78 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.81 (dd,  $J = 0.9, 7.7$  Hz, 1H, H-5), 7.17 – 7.21 (m, 1H, H-5'), 7.50 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H, H-4), 7.70 (dt,  $J = 1.8, 11.6$  Hz, 1H, H-4'), 7.99 (dd,  $J = 0.9, 7.8$  Hz, 1H, H-6'), 8.34 (td,  $J = 1.0, 8.0$  Hz, 1H, H-3), 8.57 (qd,  $J = 0.9, 4.8$  Hz, 1H, H-3').

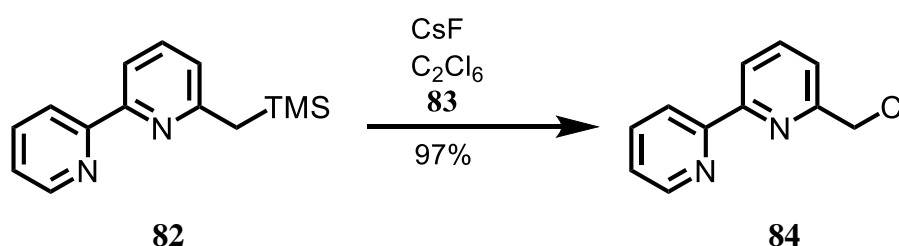


**$^{13}\text{C}$ -NMR:** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = -1.4$  (3C,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ), 30.4 ( $\text{CH}_2$ ), 116.7 (C-5), 121.2 (C-3'), 122.5 (C-5'), 123.5 (C-3), 136.8 (C-4'), 136.9 (C-4), 149.1 (C-6'), 155.7 (C-2'), 158.9 (C-2), 160.1 (C-6).

**IR:** (neat): 3058 (w), 2954 (w), 2897 (w), 1565 (m), 1455 (w), 1426 (m), 1310 (w), 1289 (w), 1249 (m), 1145 (w), 1085 (w), 991 (w), 890 (w), 841 (s), 779 (s), 763 (m), 695 (m), 639 (m), 553 (m), 458 (w), 402 (w).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{SiNa}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 265.1131; found 265.1123.

#### 6.2.2.6 6-(Chloromethyl)-2,2'-bipyridine **84**



silane <b>82</b> [241.91]	157 mg	0.65 mmol	1.0 eq
cesium fluoride [151.9]	197 mg	1.30 mmol	2.0 eq
hexachloroethane <b>83</b> [236.14]	307 mg	1.30 mmol	2.0 eq

Hexachloroethane **83** (307 mg, 1.30 mmol) was suspended in a solution of silane **82** (157 mg, 0.65 mmol) in MeCN (10 mL) and cesium fluoride (197 mg, 1.30 mmol) was added. The suspension was stirred at 60 °C for 3.5 h. The reaction mixture was poured into  $\text{H}_2\text{O}$  (10 mL) and extracted with EtOAc (3x 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (10 mL) and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash column chromatography on deactivated silica gel (EtOAc/pentane/ $\text{NH}_3$  6:4:0.1) to give chloride **84** (129 mg, 0.63 mmol, 97%) as a colorless foam.

**TLC:**  $R_f = 0.64$  (EtOAc/pentane/ $\text{NH}_3$  7:3:0.1).

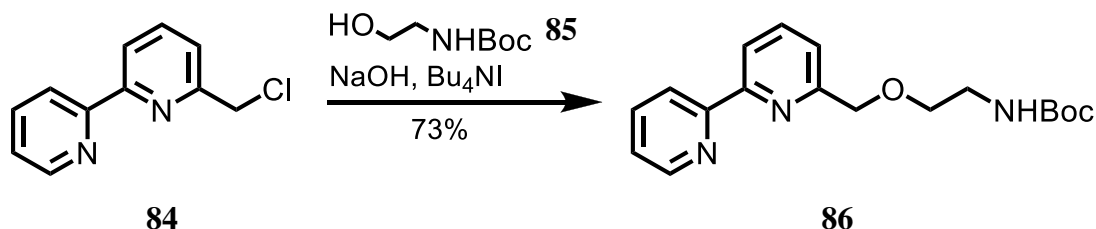
**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 4.76 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.32 (ddd,  $J$  = 1.2, 4.8, 7.5 Hz, 1H, H-5), 7.51 (dd,  $J$  = 0.8, 7.7 Hz, 1H, H-5'), 7.80 – 7.88 (m, 2H, H-4, H-4'), 8.35 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H, H-6'), 8.44 (td,  $J$  = 1.0, 8.0 Hz, 1H, H-3), 8.68 (qd,  $J$  = 0.9, 4.8 Hz, 1H, H-3').

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 47.1 (CH<sub>2</sub>), 120.4 (C-5), 121.4 (C-3'), 122.8 (C-5'), 124.0 (C-3), 137.1 (C-4'), 138.1 (C-4), 149.3 (C-6'), 155.9 (C-2'), 155.9 (C-2), 156.2 (C-6).

**IR:** (neat): 3059 (w), 3016 (w), 1576 (s), 1457 (m), 1427 (s), 1259 (m), 1149 (w), 1084 (m), 1044 (w), 991 (m), 880 (w), 824 (w), 775 (s), 747 (s), 708 (s), 620 (s), 559 (s), 484 (w), 402 (m).

**HRMS (EI):**  $m/z$  calcd for C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>Cl [M]<sup>+</sup>: 204.0454; found 204.0452.

#### 6.2.2.7 *tert*-Butyl 2-(2,2'-bipyridin-6-ylmethoxy)ethylcarbamate **86**



chloride <b>83</b> [204.66]	204 mg	1.0 mmol	1.0 eq
alcohol <b>84</b> [161.20; $\rho$ = 1.45]	0.46 mL	3.0 mmol	3.0 eq
sodium hydroxide [40.00]	400 mg	10.0 mmol	10.0 eq
tetrabutylammonium iodide [369.37]	42.0 mg	0.1 mmol	0.1 eq

To a solution of alcohol **85** (0.46 mL, 3.0 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL) was added chloride **84** (204 mg, 1.0 mmol) and a solution of sodium hydroxide (400 mg, 10 mmol) in H<sub>2</sub>O (2 mL) was added. Tetrabutylammonium iodide (42 mg, 0.1 mmol) was added and the emulsion was heated to 40 °C for 12 h. The solution was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) and washed with H<sub>2</sub>O (4x 10 mL). The organic phase was washed with brine (10 mL) and dried over MgSO<sub>4</sub>.

The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by flash column chromatography on deactivated silica gel (hexane/MTBE/NH<sub>3</sub> 75:25:1) to give bipyridine **86** (239 mg, 0.73 mmol, 73%) as a colorless foam.

**TLC:**  $R_f$  = 0.21 (hexane/MTBE/NH<sub>3</sub> 50:50:1).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 1.44 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.41 (q,  $J$  = 5.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 3.68 (t,  $J$  = 5.1 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.74 (s, 2H, ArCH<sub>2</sub>), 7.32 (ddd,  $J$  = 1.1, 4.9, 7.5 Hz, 1H, H-5), 7.45 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H, H-5'), 7.82 (dt,  $J$  = 1.8, 11.6 Hz, 1H, H-4'), 7.84 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, H-4), 8.31 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H, H-6'), 8.41 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, H-3), 8.69 (qd,  $J$  = 0.9, 4.8 Hz, 1H, H-3').

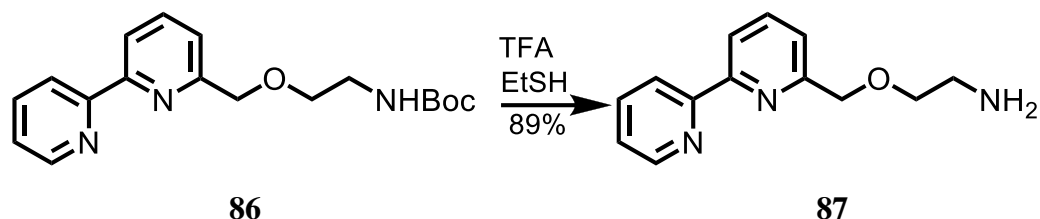
**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 28.6 (3C, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 40.7 (CH<sub>2</sub>NH), 70.2 (OCH<sub>2</sub>), 74.2 (ArCH<sub>2</sub>), 79.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 120.1 (C-5), 121.5 (C-3'), 121.6 (C-3), 123.9 (C-5'), 137.3 (C-4'), 137.7 (C-4), 149.1 (C-6'), 155.5 (C-2), 156.1 (C-2'), 158.0 (C=O).

**IR:** (neat): 3351 (s br), 2975 (m), 2931 (w), 2870 (w), 1695 (s), 1580 (m), 1515 (s), 1456 (m), 1429 (s), 1392 (w), 1365 (m), 1249 (s), 1166 (s), 1106 (s), 1043 (w), 994 (m), 865 (w), 776 (s), 751 (w), 624 (m), 597 (w), 405 (w).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 330.1812; found 330.1804.

---

#### 6.2.2.8 2-(2,2'-Bipyridin-6-ylmethoxy)ethanamine **87**



bipyridine <b>86</b> [204.66]	230 mg	0.73 mmol	1.0 eq
trifluoroacetic acid [114.02; $\rho = 1.489$ ]	50 Vol%		
ethanthiol [62.14; $\rho = 0.84$ ]	5 Vol%		

To a solution of bipyridine **86** (230 mg, 0.73 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4 mL) was added ethanthiol (0.4 mL) and trifluoroacetic acid (4 mL) at 0 °C. The solution was warmed up to RT and stirred for 30 min until TLC showed complete conversion. The solvents were removed under reduced pressure. The crude product was taken up in EtOAc (5 mL) and solid  $\text{K}_2\text{CO}_3$  was added. The suspension was stirred for 3 h and filtered through a short plug of celite. Removing of the solvent gave amine **87** (150 mg, 0.65 mmol, 89%) as a colorless resin.

**TLC:**  $R_f = 0.68$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$  10:1:0.1).

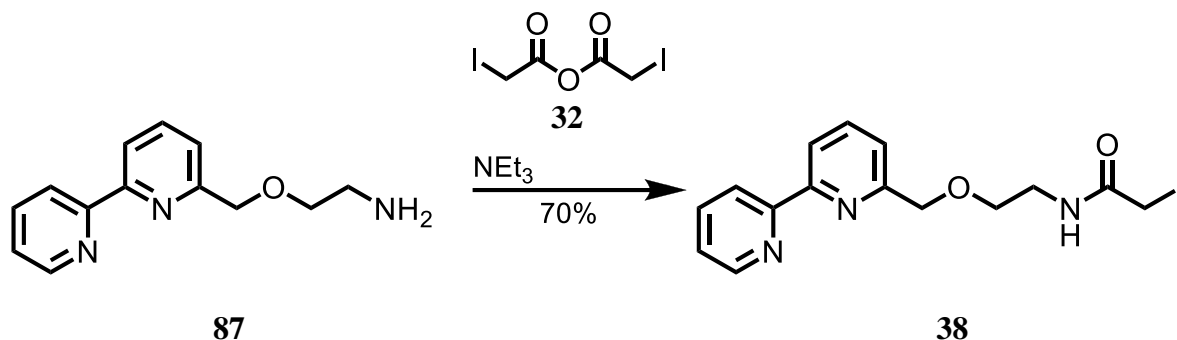
**$^1\text{H-NMR}$ :** (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta = 2.75$  (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.52 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.66 (s, 2H,  $\text{ArCH}_2$ ), 7.45 (ddd,  $J = 1.2, 4.8, 7.5$  Hz, 1H, H-5), 7.53 (d,  $J = 6.9$  Hz, 1H, H-5'), 7.93 (dt,  $J = 1.8, 11.6$  Hz, 1H, H-4'), 7.96 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H, H-4), 8.29 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1H, H-6'), 8.36 (td,  $J = 1.0, 8.0$  Hz, 1H, H-3), 8.69 (qd,  $J = 0.9, 4.8$  Hz, 1H, H-3').

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta = 41.4$  ( $\text{CH}_2\text{N}$ ), 73.0 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 73.2 ( $\text{ArCH}_2$ ), 119.0 (C-5), 120.4 (C-3'), 121.5 (C-5'), 124.2 (C-3), 137.2 (C-6'), 137.9 (C-4'), 149.3 (C-4), 154.5 (C-2), 155.1 (C-2'), 158.3 (C-6).

**IR:** (neat): 3375 (w), 2873 (w), 1672 (s), 1585 (m), 1430 (m), 1319 (w), 1205 (s), 1174 (s), 1118 (s), 994 (w), 873 (w), 834 (m), 802 (m), 775 (m), 749 (w), 720 (m), 621 (w), 592 (w), 516 (w), 404 w).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for  $C_{13}H_{16}N_3O$   $[M+H]^+$ : 230.1288; found 230.1286.

#### 6.2.2.9 *N*-(2-(2,2'-Bipyridin-6-ylmethoxy)ethyl)-2-iodoacetamide **38**



amine <b>87</b> [397.21]	150 mg	0.65 mmol	1.0 eq
triethylamine [101.19; $\rho = 0.73$ ]	0.10 mL	0.72 mmol	1.1 eq
2-iodoacetic anhydride <b>32</b> [353.88]	276 mg	0.78 mmol	1.2 eq

To a solution of amine **87** (150 mg, 0.65 mmol) and triethylamine (0.10 mL, 0.72 mmol) in  $CHCl_3$  (8 mL) was added 2-iodoacetic anhydride **32** (276 mg, 0.78 mmol) at 0 °C and the reaction was stirred for 2 h at RT. Without further treatment, the crude product was purified by flash column chromatography on deactivated silica gel ( $CH_2Cl_2/MeOH/NH_3$  100:2:1) to give iodoacetamide **38** (25 mg, 30  $\mu$ mol, 70%) as a light yellow solid.

**TLC:**  $R_f = 0.58$  ( $CHCl_3/MeOH/NH_3$  10:1:0.1).

**$^1H$ -NMR:** (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta = 3.52$  (q,  $J = 5.2$  Hz, 2H,  $CH_2N$ ), 3.66 (s, 2H,  $CH_2I$ ), 3.68 (q,  $J = 5.2$  Hz, 2H,  $CH_2O$ ), 4.71 (s, 2H, Bn- $CH_2$ ), 6.81 (s br, 1H, NH), 7.29 (ddd,  $J = 7.6$  Hz, 4.8 Hz, 1.2 Hz, 1H,  $H_{Ar}$ ), 7.41 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H,  $H_{Ar}$ ), 7.79 (td,  $J = 7.6$  Hz, 2.1 Hz, 1H,  $H_{Ar}$ ), 7.81 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H,  $H_{Ar}$ ), 8.25 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H,  $H_{Ar}$ ), 8.35 (dt,  $J = 7.8$  Hz, 0.8 Hz, 1H,  $H_{Ar}$ ), 8.66 (dq,  $J = 4.8$  Hz, 0.8 Hz, 1H,  $H_{Ar}$ ).

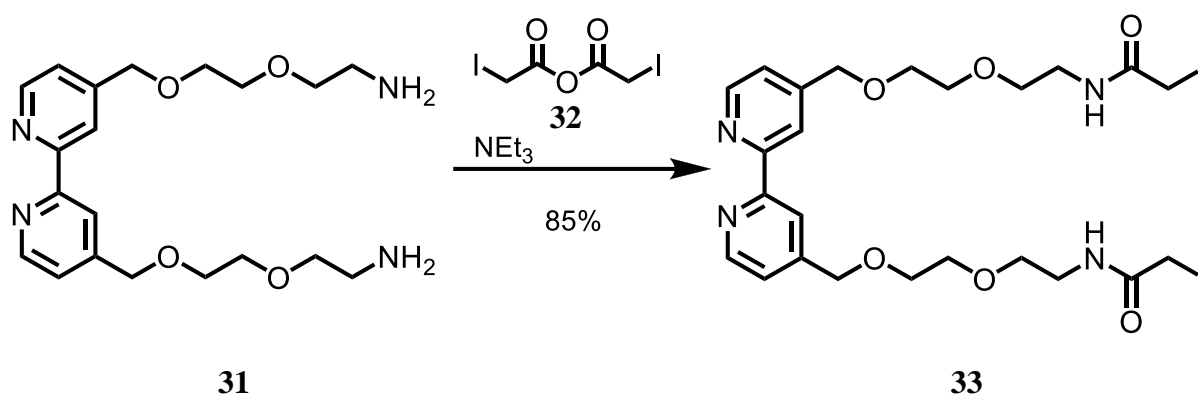
**$^{13}C$ -NMR:** (75 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta = 0.7$  ( $CH_2I$ ), 45.8 ( $CH_2N$ ), 68.7 ( $CH_2O$ ), 73.1 (Bn- $CH_2$ ), 119.1 ( $C_{Ar}$ ), 120.5 ( $C_{Ar}$ ), 121.6 ( $C_{Ar}$ ), 124.2 ( $C_{Ar}$ ), 137.8

(C<sub>Ar</sub>), 137.9, 149.2, 154.5 (C<sub>Ar,q</sub>), 155.0 (C<sub>Ar,q</sub>), 157.9 (C<sub>Ar,q</sub>), 167.8 (C=O).

**IR:** (neat): 3283 (m), 3062 (w), 3015 (w), 2924 (w), 2863 (w), 1642 (s), 1555 (s), 1455 (m), 1424 (s), 1345 (w), 1302 (m), 1258 (w), 1231 (w), 1168 (w), 1112 (w), 1081 (s), 1038 (m), 991 (m), 956 (w), 901 (w), 869 (w), 827 (m), 773 (s), 745 (s), 696 (s), 663 (w), 639 (w), 617 (w), 561 (m), 519 (w), 461 (w), 426 (w), 398 (w).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>IN<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 398.0360; found 398.0361.

**6.2.2.10 *N,N'*-(2,2'-(2,2'-(2,2'-bipyridine-4,4'-diylbis(methylene))bis(oxy))bis(ethane-2,1-diyl))bis(oxy))bis(ethane-2,1-diyl))bis(2-iodoacetamide) **33****



bisamine <b>31</b> [397.21]	302 mg	0.76 mmol	1.0 eq
triethylamine [101.19; $\rho = 0.73$ ]	0.39 mL	3.04 mmol	4.0 eq
2-iodoacetic anhydride <b>32</b> [353.88]	670 mg	1.67 mmol	2.2 eq

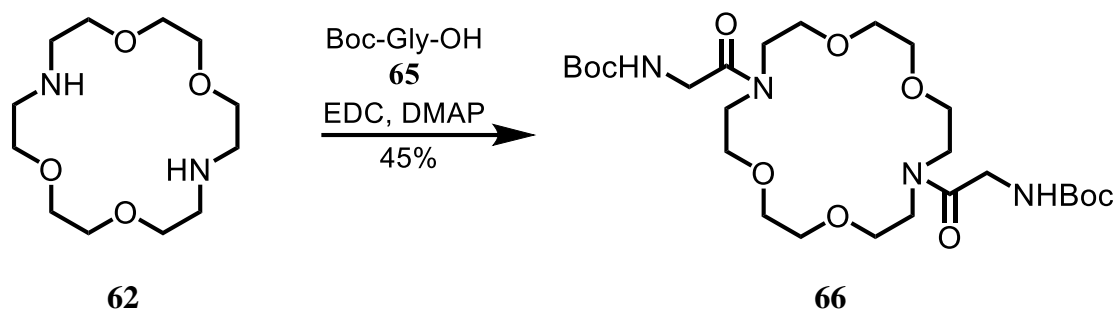
To a solution of bisamine **31** (302 mg, 0.78 mmol) and triethylamine (0.39 mL, 3.04 mmol) in CHCl<sub>3</sub> (10 mL) was added 2-iodoacetic anhydride **32** (670 mg, 1.67 mmol) at 0 °C and the reaction was stirred for 3 h at RT. Without further treatment, the crude product was purified by flash column chromatography on deactivated silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub> 100:3:1) to give bisiodoacetamid **33** (386 mg, 0.53 mmol, 70%) as a light yellow foam.

---

<b>TLC:</b>	$R_f = 0.81$ ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ 10:1:0.1)
<b><math>^1\text{H}</math>-NMR:</b>	(300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta = 3.48\text{--}3.54$ (m, 4H, $2\times\text{NHCH}_2$ ), $3.59\text{--}3.63$ (m, 8H, $2\times\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), $3.69\text{--}3.72$ (m, 8H, $2\times\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ , $2\times\text{CH}_2\text{I}$ ), $4.69$ (s, 4H, $\text{BnCH}_2$ ), $6.97$ (s br, 2H, NH), $7.32\text{--}7.34$ (m, 2H, $2\times\text{H}_{\text{Ar}}$ ), $8.44$ (d, $J = 0.8$ Hz, 2H, $2\times\text{H}_{\text{Ar}}$ ), $8.64$ (d, $J = 5.2$ Hz, 2H, $2\times\text{N-CH}_{\text{Ar}}$ ).
<b><math>^{13}\text{C}</math>-NMR:</b>	(75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta = -0.4$ ( $2\times\text{CH}_2\text{I}$ ), $40.4$ ( $2\times\text{NCH}_2$ ), $69.7$ ( $\text{C}_{\text{Glycol}}$ ), $70.3$ ( $\text{C}_{\text{Glycol}}$ ), $70.6$ ( $\text{C}_{\text{Glycol}}$ ), $71.8$ ( $2\times\text{BnCH}_2$ ), $119.7$ ( $2\times\text{C}_{\text{Ar}}$ ), $122.3$ ( $2\times\text{C}_{\text{Ar}}$ ), $149.0$ ( $2\times\text{C}_{\text{Ar}}$ ), $149.5$ ( $2\times\text{C}_{\text{Ar}}$ ), $156.4$ ( $2\times\text{C}_{\text{q,Ar}}$ ), $167.4$ ( $2\times\text{C=O}$ ).
<b>HRMS (ESI):</b>	$m/z$ calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{I}_2\text{N}_4\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 749.0309; found 749.0301.

### 6.2.3 Synthese der Diazakronen

#### 6.2.3.1 *tert*-Butyl-2,2'-(1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacyclooctadecane-7,16-diyl)bis(2-oxoethane-2,1-diyl)dicarbamate **66**



1,9-diaza-18-crown-6-ether <b>62</b> [397.21]	200 mg	0.76 mmol	1.0 eq
<i>N</i> -Boc-Gly-OH <b>65</b> [175.18]	298 mg	1.69 mmol	2.2 eq
EDC [191.70]	324 mg	1.69 mmol	2.2 eq
DMAP [122.17]	37 mg	0.30 mmol	0.4 eq

To a solution of *N*-Boc-Gly-OH **65** (298 mg, 1.69 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL) at 0 °C was added 1,9-diaza-18-crown-6-ether **62** (200 mg, 0.76 mmol), DMAP (37 mg, 0.30 mmol) and EDC (324 mg, 1.69 mmol). The solution was stirred at RT for 36 h, poured into sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> (5 mL) and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL). The combined organic layers were washed with 1 M aq. NaHSO<sub>4</sub> (5 mL), H<sub>2</sub>O (5 mL) and brine (5 mL) and dried over MgSO<sub>4</sub>. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 100:4) to give crown **66** (198 mg, 0.34 mmol, 45% (91% brsm)) as a colorless foam.

**TLC:**  $R_f$  = 0.65 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 1.44 (s, 18H, 2xC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.51 – 3.67 (m, 24H, H<sub>Krone</sub>), 3.99 (t,  $J$  = 4.7 Hz, 4H, 2x(C=O)CH<sub>2</sub>), 5.53 (dt,  $J$  = 3.0, 27.3 Hz, 2H, NHBoc).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 28.5 (6C, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 42.5 (2C, Gly-CH<sub>2</sub>), 47.7 (C<sub>1a</sub>H<sub>2</sub>N, C<sub>1a'</sub>H<sub>2</sub>N, C<sub>1b</sub>H<sub>2</sub>N or C<sub>1b'</sub>H<sub>2</sub>N), 47.9 (C<sub>1a</sub>H<sub>2</sub>N, C<sub>1a'</sub>H<sub>2</sub>N,

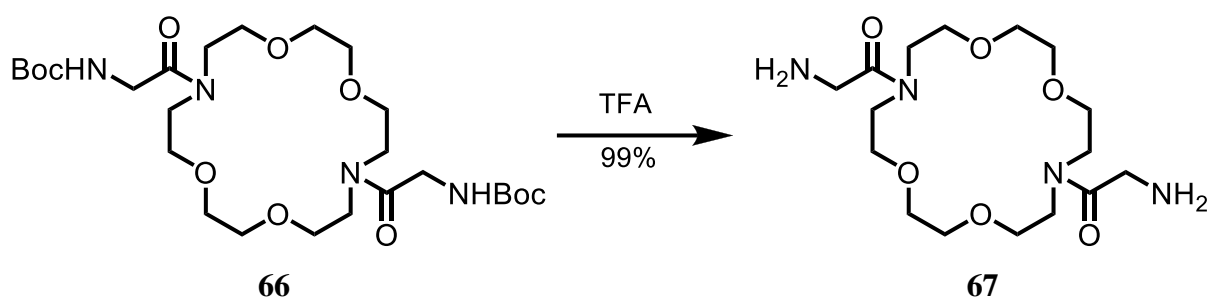


$C_{1b}H_2N$  or  $C_{1b'}H_2N$ ), 48.3 ( $C_{1a}H_2N$ ,  $C_{1a'}H_2N$ ,  $C_{1b}H_2N$  or  $C_{1b'}H_2N$ ), 48.4 ( $C_{1a}H_2N$ ,  $C_{1a'}H_2N$ ,  $C_{1b}H_2N$  or  $C_{1b'}H_2N$ ), 69.6 ( $C_{2a}H_2N$ ,  $C_{2a'}H_2N$ ,  $C_{2b}H_2N$  or  $C_{2b'}H_2N$ ), 69.7 ( $C_{2a}H_2N$ ,  $C_{2a'}H_2N$ ,  $C_{2b}H_2N$  or  $C_{2b'}H_2N$ ), 69.9 ( $C_{2a}H_2N$ ,  $C_{2a'}H_2N$ ,  $C_{2b}H_2N$  or  $C_{2b'}H_2N$ ), 70.1 ( $C_{2a}H_2N$ ,  $C_{2a'}H_2N$ ,  $C_{2b}H_2N$  or  $C_{2b'}H_2N$ ), 70.7 ( $C_{3a}H_2N$ ,  $C_{3a'}H_2N$ ,  $C_{3b}H_2N$  or  $C_{3b'}H_2N$ ), 70.8 ( $C_{3a}H_2N$ ,  $C_{3a'}H_2N$ ,  $C_{3b}H_2N$  or  $C_{3b'}H_2N$ ), 71.1 ( $C_{3a}H_2N$ ,  $C_{3a'}H_2N$ ,  $C_{3b}H_2N$  or  $C_{3b'}H_2N$ ), 71.1 ( $C_{3a}H_2N$ ,  $C_{3a'}H_2N$ ,  $C_{3b}H_2N$  or  $C_{3b'}H_2N$ ), 79.7 (2C,  $C(CH_3)_3$ ), 156.0 (2C, Boc-C=O), 168.8 (Gly-C=O), 169.1 (Gly-C=O).

**IR:** (neat): 3334 (w), 2973 (m), 2927 (m), 2868 (m), 1708 (s), 1647 (s), 1461 (s), 1389 (w), 1365 (m), 1250 (m), 1167 (s), 1114 (s), 1052 (m), 1027 (w), 949 (w), 920 (w), 867 (m), 781 (w), 732 (m), 594 (w).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for  $C_{26}H_{48}N_2O_{10}Na$   $[M+Na]^+$ : 599.3263; found 599.3253.

### 6.2.3.2 1,1'-(1,4,10,13-Tetraoxa-7,16-diazacyclooctadecane-7,16-diyl)bis(2-aminoethanone) **67**

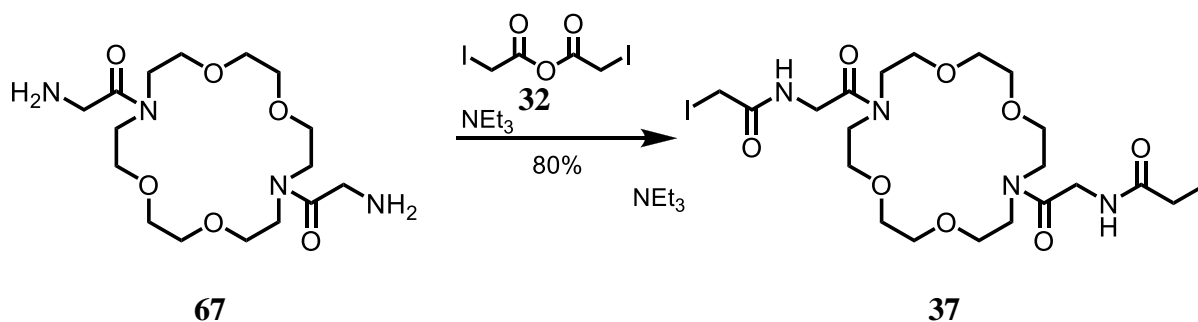


crown <b>66</b> [576.68]	198 mg	0.34 mmol	1.0 eq
trifluoroacetic acid [114.02; $\rho = 1.489$ ]	50 Vol%		

Crown **66** (198 mg, 0.34 mmol) was dissolved in  $CH_2Cl_2$  (4 mL) at 0 °C and trifluoroacetic acid (4 mL) was added. The reaction was stirred for 1 h until TLC showed complete conversion of the starting material. The solvent was removed under reduced pressure to give amine **67** (194 mg, 0.34 mmol, 99%) as TFA salt as a colorless foam.

<b>TLC:</b>	$R_f = 0.12$ ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ 10:1:0.1).
<b><math>^1\text{H-NMR}</math>:</b>	(300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) $\delta = 3.51 - 3.64$ (m, 24H, $\text{H}_{\text{Krone}}$ ), 3.88 – 3.90 (m, 4H, 2x Gly- $\text{CH}_2$ ), 8.05 (s br, 6H, $\text{NH}_3^+$ ).
<b><math>^{13}\text{C-NMR}</math>:</b>	(75 MHz, $\text{MeCN-}d_3$ ) $\delta = 41.7$ (2C, $\text{CH}_2$ ), 50.3 (2C, C-3a, C-3b), 50.5 (2C, C-3a', C-3b'), 70.1 (4C, C-5a, C-5a', C-5b, C-5b'), 70.9 (2C, C-4a, C-4b), 72.9 (2C, C-4a', C-4b'), 169.0 (2C, C=O).
<b>IR:</b>	(neat): 3159 (w), 3022 (w), 2952 (w), 1776 (w), 1680 (m), 1656 (m), 1608 (m), 1490 (m), 1463 (w), 1438 (8w), 1371 (w), 1328 (w), 1397 (w), 1266 (w), 1186 (s), 1122 (s), 1032 (w), 997 (w), 915 (m), 838 (m), 799 (m), 724 (w), 701 (m), 633 (w), 589 (w), 551 (w), 517 (w), 480 (w), 432 (w).
<b>HRMS (ESI):</b>	$m/z$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 305.2071; found 305.2069.

**6.2.3.3 *N,N'*-(2,2'-(1,4,10,13-Tetraoxa-7,16-diazacyclooctadecane-7,16-diyl)bis(2-oxoethane-2,1-diyl))bis(2-iodoacetamide) **37****



amine·TFA <b>37</b> [570.48]	50 mg	88 $\mu\text{mol}$	1.0 eq
2-iodoacetic anhydride <b>32</b> [353.88]	65 mg	184 $\mu\text{mol}$	2.1 eq
triethylamine [101.19; $\rho = 0.73$ ]	50 $\mu\text{L}$	359 $\mu\text{mol}$	4.1 eq

Amine **37** (50 mg, 88  $\mu\text{mol}$ ) and triethylamine (50  $\mu\text{L}$ , 359  $\mu\text{mol}$ ) were dissolved in  $\text{CHCl}_3$  (1 mL) in a brown glass flask and 2-iodoacetic anhydride **32** (65 mg, 184  $\mu\text{mol}$ ) was added.

The solution was stirred for 4 h and without further treatment purified by flash column chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub> 100:2:1) to give iodid **37** (50 mg, 70 μmol, 80%) as a slightly yellow foam.

**TLC:**  $R_f = 0.59$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub> 10:1:0.1).

**<sup>1</sup>H-NMR:** main isomere  
(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 3.45 - 3.69$  (m, 24H, H<sub>crown</sub>), 3.82 (s, 4H, 2x CH<sub>2</sub>I) 4.13 (d,  $J = 4.4$  Hz, 4H, 2x Gly-CH<sub>2</sub>), 7.86 (s br, 2H, 2x NH).

minor isomere  
(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 3.45 - 3.69$  (m, 24H, H<sub>crown</sub>), 3.76 (s, 4H, 2x CH<sub>2</sub>I) 4.24 (d,  $J = 4.7$  Hz, 4H, 2x Gly-CH<sub>2</sub>), 7.23 (s br, 2H, 2x NH).

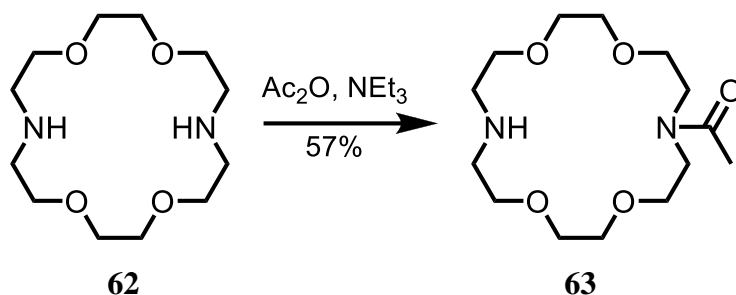
**<sup>13</sup>C-NMR:** major isomere  
(75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = -0.5$  (2x CH<sub>2</sub>I), 42.1 (2x Gly-CH<sub>2</sub>), 49.5 (2x NC<sub>a</sub>H<sub>2</sub>Crown), 49.9 (2x NC<sub>b</sub>H<sub>2</sub>Crown), 69.4 (2x OC<sub>a</sub>H<sub>2</sub>Crown), 70.8 (2x OC<sub>b</sub>H<sub>2</sub>Crown), 71.2 (2x OC<sub>c</sub>H<sub>2</sub>Crown), 72.6 (2x OC<sub>d</sub>H<sub>2</sub>Crown), 168.0 (2x Gly-C=O), 169.1 (2x C=O).

minor isomere  
(75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = -1.1$  (2x CH<sub>2</sub>I), 42.5 (2x Gly-CH<sub>2</sub>), 48.1 (2x NC<sub>a</sub>H<sub>2</sub>Crown), 48.6 (2x NC<sub>b</sub>H<sub>2</sub>Crown), 69.6 (2x OC<sub>a</sub>H<sub>2</sub>Crown), 69.9 (2x OC<sub>b</sub>H<sub>2</sub>Crown), 70.8 (2x OC<sub>c</sub>H<sub>2</sub>Crown), 71.3 (2x OC<sub>d</sub>H<sub>2</sub>Crown), 167.3 (2x Gly-C=O), 168.1 (2x C=O).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>I<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 735.0364; found 735.0369.

---

#### 6.2.3.4 1-(1,4,10,13-Tetraoxa-7,16-diazacyclooctadecan-7-yl)ethanone **63**



1,9-diaza-18-crown-6-ether <b>62</b> [397.21]	100 mg	0.38 mmol	2.0 eq
acetic anhydride [102.09; $\rho = 1.08$ ]	18 $\mu\text{L}$	0.19 mmol	1.0 eq
triethylamine [101.19; $\rho = 0.73$ ]	53 $\mu\text{L}$	0.38 mmol	2.0 eq

To a solution of 1,9-diaza-18-crown-6-ether **62** (100 mg, 0.38 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) at 0 °C was added triethylamine (53  $\mu\text{L}$ , 0.38 mmol) and acetic anhydride (18  $\mu\text{L}$ , 0.19 mmol). The reaction was stirred for 3 h and poured into a separation funnel containing sat. aq.  $\text{NaHCO}_3$  (10 mL). The aqueous layer was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL) and the combined organic layers were washed with  $\text{H}_2\text{O}$  (5 mL) and brine (5 mL) and dried over  $\text{MgSO}_4$ . The crude product was purified by flash column chromatography on deactivated silica gel ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$  100:4:1) to give acetamide **63** (33 mg, 0.11 mmol, 57%) as a colorless, low melting solid.

**TLC:**  $R_f = 0.39$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$  10:1:0.1).

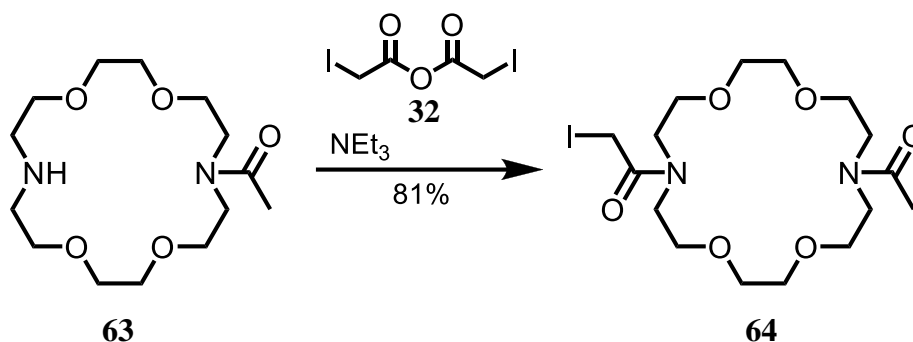
**$^1\text{H-NMR}$ :** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 1.97$  (s br, 1H, NH), 2.11 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.77 – 2.82 (m, 4H, 2xNHCH $_2$ ), 3.59 – 3.65 (m, 20H, 8xCH $_2$ O, 2xNCH $_2$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 21.7$  ( $\text{CH}_3$ ), 46.0 (2C, NH(CH $_2$ ) $_2$ ), 49.4 (NC $_a$ H $_2$ ), 49.5 (NC $_b$ H $_2$ ), 69.5 (CH $_2$ O), 70.1 (CH $_2$ O), 70.3 (CH $_2$ O), 70.4 (CH $_2$ O), 70.4 (CH $_2$ O), 70.6 (CH $_2$ O), 70.6 (CH $_2$ O), 70.6 (CH $_2$ O), 170.9 (C=O).

**IR:** (neat): 3424 (m, br), 2866 (m), 1624 (s), 1447 (m), 1354 (w), 1394 (w), 1248 (w), 1107 (s), 1027 (m), 827 (w), 597 (w), 530 (w).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for  $C_{14}H_{29}N_2O_5$   $[M+H]^+$ : 305.2071; found 305.2069.

**6.2.3.5 1-(16-Acetyl-1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacyclooctadecan-7-yl)-2-iodoethanone **64****



acetamide <b>63</b> [304.38]	33 mg	0.11 mmol	1.0 eq
2-iodoacetic anhydride <b>32</b> [353.88]	46 mg	0.13 mmol	1.2 eq
triethylamine [101.19; $\rho = 0.73$ ]	15 $\mu$ L	0.11 mmol	1.0 eq

To a solution of acetamide **63** (33 mg, 0.11 mmol) in  $\text{CHCl}_3$  (2 mL) in a brown glass flask was added triethylamine (15  $\mu$ L, 0.11 mmol) and 2-iodoacetic anhydride **32** (46 mg, 0.13 mmol). The solution was stirred for 2.5 h until TLC showed complete conversion of the starting material. Without further treatment, the crude product was purified by flash column chromatography on silica gel ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  100:2) to give monoiodide **64** (41 mg, 0.09 mmol, 81%) as a colorless foam.

**TLC:**  $R_f = 0.60$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$  10:1:0.1).

Mixture of conformation isomers.

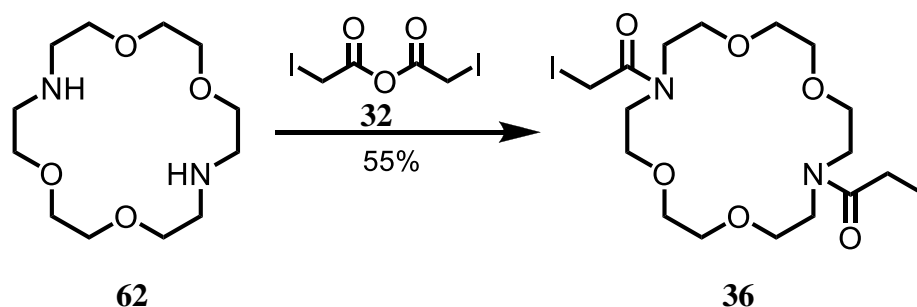
**$^1\text{H-NMR}$ :** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 2.08$  and  $2.08$  (s, 3H, H-14<sub>a</sub>, H-14<sub>b</sub>), 3.56 – 3.64 (m, 22H, H-5<sub>a/b</sub>, H-5'<sub>a/b</sub>, H-7<sub>a/b</sub>, H-7'<sub>a/b</sub>, H-8<sub>a/b</sub>, H-8'<sub>a/b</sub>, H-10<sub>a/b</sub>, H-10'<sub>a/b</sub>, H-11<sub>a/b</sub>, H-11'<sub>a/b</sub> and H-4<sub>a/b</sub> or H-4'<sub>a/b</sub>), 3.72 – 3.76 (m, 2H, H-4<sub>a/b</sub> or H-4'<sub>a/b</sub>), 3.79 and 3.79 (s, 2H, H-1<sub>a</sub>, H-1<sub>b</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = -2.4 (C-1<sub>a</sub> or C-1<sub>b</sub>), -2.4 (C-1<sub>a</sub> or C-1<sub>b</sub>), 21.7 (C-14<sub>a</sub> or C-14<sub>b</sub>), 21.7 (C-14<sub>a</sub> or C-14<sub>b</sub>), 47.1 (C-4<sub>a</sub>, C-4<sub>a</sub>', C-4<sub>b</sub> or C-4<sub>b</sub>'), 47.2 (C-4<sub>a</sub>, C-4<sub>a</sub>', C-4<sub>b</sub> or C-4<sub>b</sub>'), 48.3 (C-4<sub>a</sub>, C-4<sub>a</sub>', C-4<sub>b</sub> or C-4<sub>b</sub>'), 48.3 (C-4<sub>a</sub>, C-4<sub>a</sub>', C-4<sub>b</sub> or C-4<sub>b</sub>'), 49.9 (C-11<sub>a</sub>, C-11<sub>a</sub>', C-11<sub>b</sub> or C-11<sub>b</sub>'), 50.0 (C-11<sub>a</sub>, C-11<sub>a</sub>', C-11<sub>b</sub> or C-11<sub>b</sub>'), 50.9 (C-11<sub>a</sub>, C-11<sub>a</sub>', C-11<sub>b</sub> or C-11<sub>b</sub>'), 51.0 (C-11<sub>a</sub>, C-11<sub>a</sub>', C-11<sub>b</sub> or C-11<sub>b</sub>'), 69.3 (C<sub>Crown</sub>), 69.6 (C<sub>Crown</sub>), 69.6 (C<sub>Crown</sub>), 9.6 (C<sub>Crown</sub>), 69.9 (C<sub>Crown</sub>), 70.1 (C<sub>Crown</sub>), 70.2 (C<sub>Crown</sub>), 70.4 (C<sub>Crown</sub>), 70.5 (C<sub>Crown</sub>), 70.6 (C<sub>Crown</sub>), 70.7 (C<sub>Crown</sub>), 70.9 (C<sub>Crown</sub>), 70.9 (C<sub>Crown</sub>), 70.9 (2C, 2x C<sub>Crown</sub>), 71.1 (C<sub>Crown</sub>), 168.5 (C-2<sub>a</sub> or C-2<sub>b</sub>), 168.5 (C-2<sub>a</sub> or C-2<sub>b</sub>), 170.9 (C-13<sub>a</sub> or C-13<sub>b</sub>), 170.9 (C-13<sub>a</sub> or C-13<sub>b</sub>).

**IR:** (neat): 3477 (w br), 2865 (m), 1629 (s), 1447 (m), 1417 (m), 1355 (m), 1288 (w), 1244 (w), 1200 (w), 1110 (s), 1073 (s), 1029 (m), 917 (w), 818 (w), 606 (w), 541 (w).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for  $C_{16}H_{29}IN_2O_6Na$   $[M+Na]^+$ : 495.0963; found 495.0960.

**6.2.3.6 1,1'-(1,4,10,13-Tetraoxa-7,16-diazacyclooctadecane-7,16-diyl)bis(2-iodoethanone) 36**



1,9-diaza-18-crown-6-ether <b>62</b> [397.21]	50 mg	0.19 mmol	1.0 eq
2-iodoacetic anhydride <b>32</b> [353.88]	148 mg	0.42 mmol	2.2 eq

To a solution of 1,9-diaza-18-crown-6-ether **62** (50 mg, 0.19 mmol) in CHCl<sub>3</sub> (3 mL) in a brown glass flask was added 2-iodoacetic anhydride **32** (148 mg, 0.42 mmol). The solution

was stirred for 3 h. Without further treatment, the crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 100:2) to give moniodid **36** (62 mg, 0.10 mmol, 55% (92% brsm)) as a colorless foam.

**TLC:**  $R_f = 0.54$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub> 10:1:0.1).

Mixture of conformation isomers.

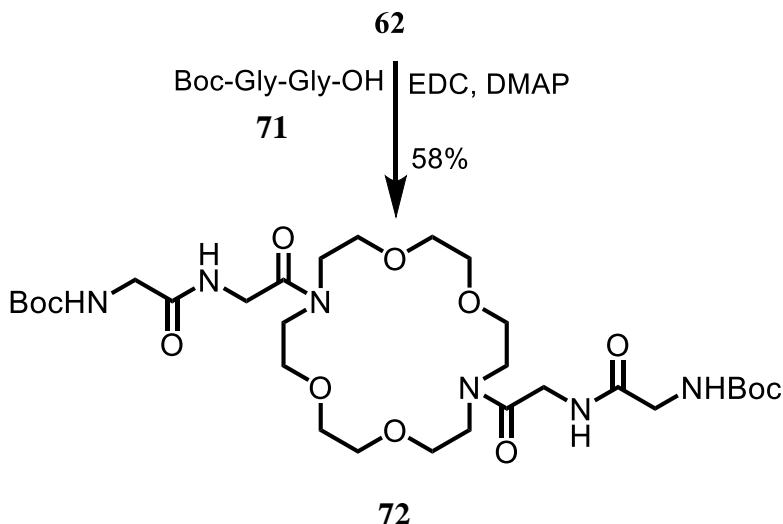
**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 3.60 - 3.64$  (m, 16H, H<sub>Krone</sub>), 3.72 (s, 4H, CH<sub>2</sub>I), 3.75 – 3.79 (m, 4H, H<sub>Krone</sub>), 3.85 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H, H<sub>Krone</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = -5.9$  (CH<sub>2</sub>I),  $-2.8$  (CH<sub>2</sub>I), 48.6 (2C, C<sub>1a</sub>H<sub>2</sub>N, C<sub>1a</sub>'H<sub>2</sub>N, C<sub>1b</sub>H<sub>2</sub>N or C<sub>1b</sub>'H<sub>2</sub>N), 51.2 (C<sub>1a</sub>H<sub>2</sub>N, C<sub>1a</sub>'H<sub>2</sub>N, C<sub>1b</sub>H<sub>2</sub>N or C<sub>1b</sub>'H<sub>2</sub>N), 51.2 (C<sub>1a</sub>H<sub>2</sub>N, C<sub>1a</sub>'H<sub>2</sub>N, C<sub>1b</sub>H<sub>2</sub>N or C<sub>1b</sub>'H<sub>2</sub>N), 69.4 (C<sub>2a</sub>H<sub>2</sub>N, C<sub>2a</sub>'H<sub>2</sub>N, C<sub>2b</sub>H<sub>2</sub>N or C<sub>2b</sub>'H<sub>2</sub>N), 69.6 (C<sub>2a</sub>H<sub>2</sub>N, C<sub>2a</sub>'H<sub>2</sub>N, C<sub>2b</sub>H<sub>2</sub>N or C<sub>2b</sub>'H<sub>2</sub>N), 69.6 (C<sub>2a</sub>H<sub>2</sub>N, C<sub>2a</sub>'H<sub>2</sub>N, C<sub>2b</sub>H<sub>2</sub>N or C<sub>2b</sub>'H<sub>2</sub>N), 69.9 (C<sub>2a</sub>H<sub>2</sub>N, C<sub>2a</sub>'H<sub>2</sub>N, C<sub>2b</sub>H<sub>2</sub>N or C<sub>2b</sub>'H<sub>2</sub>N), 70.7 (C<sub>3a</sub>H<sub>2</sub>N, C<sub>3a</sub>'H<sub>2</sub>N, C<sub>3b</sub>H<sub>2</sub>N or C<sub>3b</sub>'H<sub>2</sub>N), 70.9 (C<sub>3a</sub>H<sub>2</sub>N, C<sub>3a</sub>'H<sub>2</sub>N, C<sub>3b</sub>H<sub>2</sub>N or C<sub>3b</sub>'H<sub>2</sub>N), 71.1 (C<sub>3a</sub>H<sub>2</sub>N, C<sub>3a</sub>'H<sub>2</sub>N, C<sub>3b</sub>H<sub>2</sub>N or C<sub>3b</sub>'H<sub>2</sub>N), 71.1 (C<sub>3a</sub>H<sub>2</sub>N, C<sub>3a</sub>'H<sub>2</sub>N, C<sub>3b</sub>H<sub>2</sub>N or C<sub>3b</sub>'H<sub>2</sub>N), 169.3 (C=O), 172.7 (C=O).

**IR:** (neat): 2868 (m, br), 2608 (w), 1716 (s), 1599 (s), 1458 (m), 1422 (m), 1353 (w), 1253 (s), 1075 (s), 896 (m), 848 (w), 734 (w), 619 (m), 553 (w), 498 (w), 434 (w).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>I<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 620.9929; found 620.9927.

**6.2.3.7 *tert*-Butyl-2,2'-(2,2'-(1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacyclooctadecane-7,16-diyl)bis(2-oxoethane-2,1-diyl))bis(azanediy)bis(2-oxoethane-2,1-diyl)dicarbamate **72****



1,9-diaza-18-crown-6-ether <b>62</b> [397.21]	100 mg	0.38 mmol	1.0 eq
dipeptid <b>71</b> [232.23]	186 mg	0.80 mmol	2.1 eq
EDC [191.69]	183 mg	0.95 mmol	2.5 eq
DMAP [122.17]	9 mg	0.08 mmol	0.2 eq

To a solution of 1,9-diaza-18-crown-6-ether **62** (100 mg, 0.38 mmol) and dipeptid **71** (186 mg, 0.80 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) was added DMAP (9 mg, 0.08 mmol). The mixture was cooled down to 0 °C and EDC (183 mg, 0.95 mmol) was added. The solution was allowed to warm up to RT and stirred overnight. The reaction mixture was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) and washed with sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> (5 mL), 2 M NaHSO<sub>4</sub> (10 mL), H<sub>2</sub>O (5 mL) and brine (5 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and the solvent was removed to give crown **72** (0.152 mg, 0.22 mmol, 58%) as a colorless foam.

**TLC:**  $R_f$  = 0.51 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR:** main isomere:  
 (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 1.45 (s, 18H, 2x *t*Bu), 3.44 – 3.70 (m, 24H, H<sub>Crown</sub>), 3.95 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 4H, 2x CH<sub>2</sub>NHBoc), 4.24 (d,  $J$  = 4.7 Hz, 4H, 2x Gly-CH<sub>2</sub>), 5.75 (s, 2H, 2x NHBoc), 7.70 (s, 2H, 2x NH).



minor isomere:

(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 1.42 (s, 18H, 2x *t*Bu), 3.44 – 3.70 (m, 24H, H<sub>Crown</sub>), 3.87 (d,  $J$  = 5.8 Hz, 4H, 2x CH<sub>2</sub>NHBoc), 4.12 (d,  $J$  = 4.1 Hz, 4H, 2x Gly-CH<sub>2</sub>), 5.34 (s, 2H, 2x NHBoc), 7.08 (s, 2H, 2x NH).

mixture of conformation isomeres

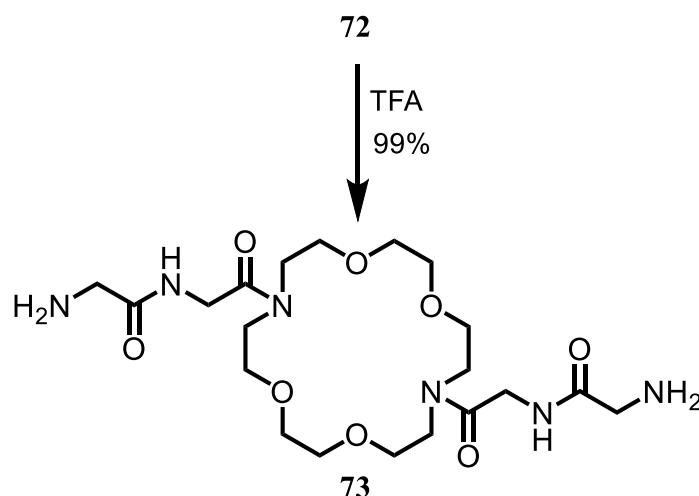
**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 28.5 (3C, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.5 (3C, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 41.1 (CH<sub>2</sub>), 41.4 (C'H<sub>2</sub>), 44.3 (2C, CH<sub>2</sub>NHBoc, C'H<sub>2</sub>NHBoc), 48.0 (C<sub>1a</sub>H<sub>2</sub>N, C<sub>1a</sub>'H<sub>2</sub>N, C<sub>1b</sub>H<sub>2</sub>N or C<sub>1b</sub>'H<sub>2</sub>N), 48.6 (C<sub>1a</sub>H<sub>2</sub>N, C<sub>1a</sub>'H<sub>2</sub>N, C<sub>1b</sub>H<sub>2</sub>N or C<sub>1b</sub>'H<sub>2</sub>N), 49.5 (C<sub>1a</sub>H<sub>2</sub>N, C<sub>1a</sub>'H<sub>2</sub>N, C<sub>1b</sub>H<sub>2</sub>N or C<sub>1b</sub>'H<sub>2</sub>N), 50.0 (C<sub>1a</sub>H<sub>2</sub>N, C<sub>1a</sub>'H<sub>2</sub>N, C<sub>1b</sub>H<sub>2</sub>N or C<sub>1b</sub>'H<sub>2</sub>N), 69.4 (C<sub>2a</sub>H<sub>2</sub>O, C<sub>2a</sub>'H<sub>2</sub>O, C<sub>2b</sub>H<sub>2</sub>O or C<sub>2b</sub>'H<sub>2</sub>O), 69.6 (C<sub>2a</sub>H<sub>2</sub>O, C<sub>2a</sub>'H<sub>2</sub>O, C<sub>2b</sub>H<sub>2</sub>O or C<sub>2b</sub>'H<sub>2</sub>O), 70.0 (C<sub>2a</sub>H<sub>2</sub>O, C<sub>2a</sub>'H<sub>2</sub>O, C<sub>2b</sub>H<sub>2</sub>O or C<sub>2b</sub>'H<sub>2</sub>O), 70.7 (C<sub>2a</sub>H<sub>2</sub>O, C<sub>2a</sub>'H<sub>2</sub>O, C<sub>2b</sub>H<sub>2</sub>O or C<sub>2b</sub>'H<sub>2</sub>O), 70.8 (C<sub>3a</sub>H<sub>2</sub>O, C<sub>3a</sub>'H<sub>2</sub>O, C<sub>3b</sub>H<sub>2</sub>O or C<sub>3b</sub>'H<sub>2</sub>O), 71.1 (C<sub>3a</sub>H<sub>2</sub>O, C<sub>3a</sub>'H<sub>2</sub>O, C<sub>3b</sub>H<sub>2</sub>O or C<sub>3b</sub>'H<sub>2</sub>O), 71.2 (C<sub>3a</sub>H<sub>2</sub>O, C<sub>3a</sub>'H<sub>2</sub>O, C<sub>3b</sub>H<sub>2</sub>O or C<sub>3b</sub>'H<sub>2</sub>O), 72.6 (C<sub>3a</sub>H<sub>2</sub>O, C<sub>3a</sub>'H<sub>2</sub>O, C<sub>3b</sub>H<sub>2</sub>O or C<sub>3b</sub>'H<sub>2</sub>O), 80.3 (2C, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 156.1 (2C, COO*t*Bu), 168.4 (C=O), 169.2 (C=O), 169.6 (C=O), 170.0 (C=O).

**IR:** (neat): 3315 (m), 2975 (w), 2869 (w), 2630 (w), 1708 (w), 1640 (s), 1515 (m), 1477 (m), 1366 (m), 1277 (w), 1248 (m), 1166 (s), 1110 (s), 1052 (w), 1027 (w), 942 (w), 917 (m), 865 (w), 785 (w), 730 (m), 645 (w), 592 (w), 541 (w).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for C<sub>30</sub>H<sub>54</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 713.3692; found 713.3686.

---

**6.2.3.8 N,N'-(2,2'-(1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacyclooctadecane-7,16-diyl)bis(2-oxoethane-2,1-diyl))bis(2-aminoacetamide) 72**



biscarbamat <b>72</b> [690.78]	152 mg	0.22 mmol	1.0 eq
trifluoroacetic acid [114.02; $\rho = 1.489$ ]	50 Vol%		

Biscarbamat **72** (152 mg, 0.22 mmol) was dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL) at 0 °C and trifluoroacetic acid (5 mL) was added. The reaction was stirred for 45 min until TLC showed complete conversion of the starting material. The solvent was removed under reduced pressure to give bisamine **73** (107 mg, 0.22 mmol, 99%) as TFA salt as a colorless, thick oil.

**TLC:**  $R_f = 0.34$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$  10:1:0.1).

**$^1\text{H-NMR}$ :** (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta = 3.52 - 3.57$  (m, 20H,  $\text{H}_{\text{Crown}}$ ), 3.62 – 3.63 (m, 8H, 2x  $\text{CH}_2\text{NHBoc}$ ,  $\text{H}_{\text{Crown}}$ ), 4.08 (d,  $J = 5.2$  Hz, 4H, 2x Gly- $\text{CH}_2$ ), 8.03 (s br, 6H, 2x  $\text{NH}_3^+$ ), 8.48 – 8.50 (m, 2H, 2x NH).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 41.1$  ( $\text{CH}_2$ ), 41.4 ( $\text{C}'\text{H}_2$ ), 42.1 (2C,  $\text{CH}_2\text{NH}_3^+$ ,  $\text{C}'\text{H}_2\text{NH}_3^+$ ), 47.2 ( $\text{C}_{1a}\text{H}_2\text{N}$ ,  $\text{C}_{1a}'\text{H}_2\text{N}$ ,  $\text{C}_{1b}\text{H}_2\text{N}$  or  $\text{C}_{1b}'\text{H}_2\text{N}$ ), 48.1 ( $\text{C}_{1a}\text{H}_2\text{N}$ ,  $\text{C}_{1a}'\text{H}_2\text{N}$ ,  $\text{C}_{1b}\text{H}_2\text{N}$  or  $\text{C}_{1b}'\text{H}_2\text{N}$ ), 48.0 ( $\text{C}_{1a}\text{H}_2\text{N}$ ,  $\text{C}_{1a}'\text{H}_2\text{N}$ ,  $\text{C}_{1b}\text{H}_2\text{N}$  or  $\text{C}_{1b}'\text{H}_2\text{N}$ ), 49.3 ( $\text{C}_{1a}\text{H}_2\text{N}$ ,  $\text{C}_{1a}'\text{H}_2\text{N}$ ,  $\text{C}_{1b}\text{H}_2\text{N}$  or  $\text{C}_{1b}'\text{H}_2\text{N}$ ), 68.2 ( $\text{C}_{2a}\text{H}_2\text{N}$ ,  $\text{C}_{2a}'\text{H}_2\text{N}$ ,  $\text{C}_{2b}\text{H}_2\text{N}$  or  $\text{C}_{2b}'\text{H}_2\text{N}$ ), 68.9 ( $\text{C}_{2a}\text{H}_2\text{N}$ ,  $\text{C}_{2a}'\text{H}_2\text{N}$ ,  $\text{C}_{2b}\text{H}_2\text{N}$  or  $\text{C}_{2b}'\text{H}_2\text{N}$ ), 69.4 ( $\text{C}_{2a}\text{H}_2\text{N}$ ,  $\text{C}_{2a}'\text{H}_2\text{N}$ ,  $\text{C}_{2b}\text{H}_2\text{N}$  or  $\text{C}_{2b}'\text{H}_2\text{N}$ ),

**IR:** (neat): 3145 (m), 3015 (w), 2974 (m), 2811 (w), 2789 (w), 1747 (w), 1638 (s), 1587 (m), 1464 (m), 1421 (w), 1321 (m), 1223 (w), 1210 (m), 1175 (s), 1132 (s), 1054 (w), 1014 (w), 978 (w), 954 (w), 922 (m), 832 (w), 776 (w), 733 (m), 657 (w), 558 (w), 542 (w).

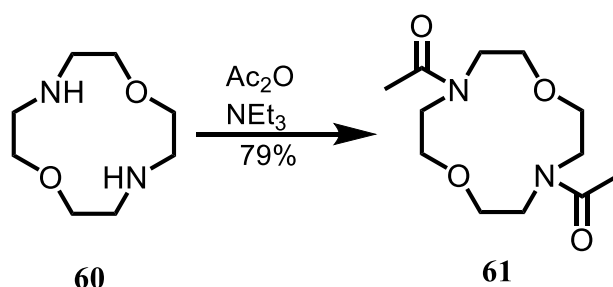
#### 6.2.3.9 1,1'-(1,7-Dioxa-4,10-diazacyclododecane-4,10-diyl)bis(2-iodoethanone) 35



- 147 -

<b>TLC:</b>	$R_f = 0.57$ ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10:1).
<b><math>^1\text{H-NMR}</math>:</b>	(300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta = 1.56$ (s, 4H, 2x $\text{CH}_2\text{I}$ ), 3.42 – 3.51 (m, 6H, $\text{H}_{\text{Crown}}$ ), 3.65 – 3.85 (m, 10H, $\text{H}_{\text{Crown}}$ ).
<b><math>^{13}\text{C-NMR}</math>:</b>	(75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta = -2.4$ ( $\text{CH}_2\text{I}$ ), $-1.5$ ( $\text{CH}_2\text{I}$ ), 49.6 ( $\text{C}_{1a}\text{H}_2\text{N}$ , $\text{C}_{1a}'\text{H}_2\text{N}$ , $\text{C}_{1b}\text{H}_2\text{N}$ or $\text{C}_{1b}'\text{H}_2\text{N}$ ), 50.5 ( $\text{C}_{1a}\text{H}_2\text{N}$ , $\text{C}_{1a}'\text{H}_2\text{N}$ , $\text{C}_{1b}\text{H}_2\text{N}$ or $\text{C}_{1b}'\text{H}_2\text{N}$ ), 52.0 ( $\text{C}_{1a}\text{H}_2\text{N}$ , $\text{C}_{1a}'\text{H}_2\text{N}$ , $\text{C}_{1b}\text{H}_2\text{N}$ or $\text{C}_{1b}'\text{H}_2\text{N}$ ), 53.3 ( $\text{C}_{1a}\text{H}_2\text{N}$ , $\text{C}_{1a}'\text{H}_2\text{N}$ , $\text{C}_{1b}\text{H}_2\text{N}$ or $\text{C}_{1b}'\text{H}_2\text{N}$ ), 67.8 ( $\text{C}_{2a}\text{H}_2\text{O}$ , $\text{C}_{2a}'\text{H}_2\text{O}$ , $\text{C}_{2b}\text{H}_2\text{O}$ or $\text{C}_{2b}'\text{H}_2\text{O}$ ), 68.1 ( $\text{C}_{2a}\text{H}_2\text{O}$ , $\text{C}_{2a}'\text{H}_2\text{O}$ , $\text{C}_{2b}\text{H}_2\text{O}$ or $\text{C}_{2b}'\text{H}_2\text{O}$ ), 69.1 ( $\text{C}_{2a}\text{H}_2\text{O}$ , $\text{C}_{2a}'\text{H}_2\text{O}$ , $\text{C}_{2b}\text{H}_2\text{O}$ or $\text{C}_{2b}'\text{H}_2\text{O}$ ), 69.5 ( $\text{C}_{2a}\text{H}_2\text{O}$ , $\text{C}_{2a}'\text{H}_2\text{O}$ , $\text{C}_{2b}\text{H}_2\text{O}$ or $\text{C}_{2b}'\text{H}_2\text{O}$ ), 168.6 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 168.9 ( $\text{C}=\text{O}$ ).
<b>IR:</b>	(neat): 3466 (w), 2920 (m), 2862 (m), 2240 (w), 1739 (w), 1632 (s), 1456 (m), 1410 (m), 1358 (m), 1290 (w), 1256 (w), 1198 (w), 1118 (s), 1066 (s), 978 (w), 913 (m), 805 (w), 727 (s), 645 (w), 605 (m), 556 (w), 453 (w).
<b>HRMS (ESI):</b>	$m/z$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{I}_2\text{N}_2\text{O}_4\text{H}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 510.9585; found 510.9582.

#### 6.2.3.10 1,1'-(1,7-Dioxa-4,10-diazacyclododecane-4,10-diyl)diethanone **61**



1,7-diaza-12-crown-4-ether <b>60</b> [174.24]	20 mg	0.11 mmol	1.0 eq
acetic anhydride [102.09; $\rho = 1.08$ ]	2.30 mL	2.30 mmol	20 eq
triethylamine [101.19; $\rho = 0.73$ ]	0.03 mL	0.23 mmol	2.0 eq

To a solution of 1,7-diaza-12-crown-4-ether **60** (100 mg, 0.38 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) was added triethylamine (0.08 mL, 0.29 mmol) and acetic anhydride (233 mg, 0.63 mmol). The solution was stirred overnight and poured into 2 M aq. NaHSO<sub>4</sub>. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL). The combined organic layers were washed with sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> (5 mL) and brine (5 mL) and dried over MgSO<sub>4</sub>. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 100:2) to give acetamid **61** (22 mg, 0.09 mmol, 79%) as a colorless foam.

**TLC:**  $R_f$  = 0.49 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 2.12 (s, 6H, 2x CH<sub>2</sub>D), 3.41 – 3.46 (m, 4H, H<sub>Crown</sub>), 3.48 – 3.52 (m, 2H, H<sub>Crown</sub>), 3.63 – 3.69 (m, 4H, H<sub>Crown</sub>), 3.75 – 3.82 (m, 4H, H<sub>Crown</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 21.8 (CH<sub>3</sub>), 22.1 (CH<sub>3</sub>), 47.8 (CH<sub>2</sub>N), 48.2 (CH<sub>2</sub>N), 50.3 (CH<sub>2</sub>N), 51.4 (CH<sub>2</sub>N), 67.5 (CH<sub>2</sub>O), 67.8 (CH<sub>2</sub>O), 68.7 (CH<sub>2</sub>O), 68.9 (CH<sub>2</sub>O), 170.1 (C=O), 170.4 (C=O).

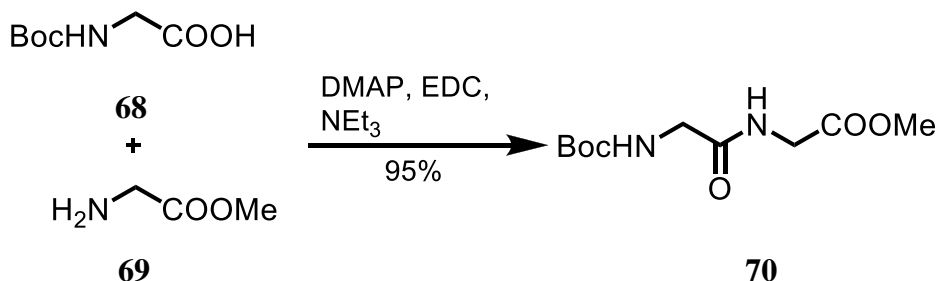
**IR:** (neat): 3310 (w), 2897 (m), 2812 (m), 2120 (w), 1714 (s), 1516 (m), 1478 (m), 1314 (w), 1288 (w), 1201 (w), 1156 (s), 1089 (s), 978 (w), 935 (m), 884 (w), 746 (s), 689 (w), 634 (m), 567 (w), 498 (w).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 281.1477; found 281.1471.

---

## 6.2.4 Synthese der Peptide

### 6.2.4.1 Methyl 2-(2-(*tert*-butoxycarbonylamino)acetamido)acetate **70**<sup>[95]</sup>



Boc-Gly-OH <b>68</b> [175.18]	600 mg	3.43 mmol	1.0 eq
H-Gly-OMe·HCl <b>69</b> [125.55]	431 mg	3.43 mmol	1.0 eq
DMAP [122.17]	41 mg	0.34 mmol	0.1 eq
EDC [191.69]	820 mg	4.28 mmol	1.25 eq
triethylamine [101.19; $\rho = 0.73$ ]	0.71 mL	5.15 mmol	1.5 eq

Boc-Gly-OH **68** (600 mg, 3.43 mmol) and H-Gly-OMe·HCl **69** (431 mg, 3.43 mmol) were dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL). DMAP (41 mg, 0.34 mmol) and triethylamine (0.71 mL, 5.15 mmol) were added. The solution was stirred for 5 min and EDC (820 mg, 4.28 mmol) was added. The reaction was stirred overnight and poured into sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> (10 mL). The organic layer was separated and washed with 2 M aq. NaHSO<sub>4</sub> (10 mL), H<sub>2</sub>O (10 mL) and brine (10 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and the solvent was removed to give dipetide **70** (800 mg, 3.26 mmol, 95%) as a thick, colorless oil.

**TLC:**  $R_f = 0.68$  (EtOAc/hexane 1:1).

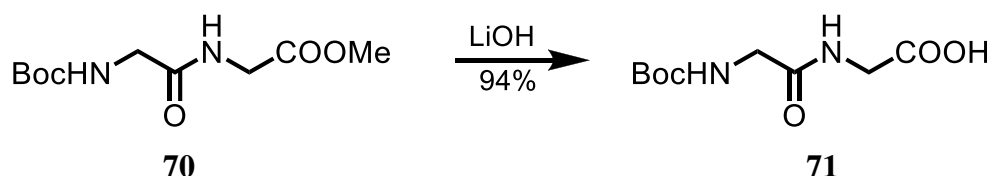
**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 1.45$  (s, 9H, *t*Bu), 3.75 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.85 (d,  $J = 5.9$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.06 (d,  $J = 5.3$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.22 (s, 1H, NH-Boc), 6.72 (s, 1H, NH).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 28.4$  (3C, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 41.2 (CH<sub>2</sub>COO), 44.4 (CH<sub>2</sub>NHBoc), 52.5 (CH<sub>3</sub>), 80.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 158.4 (NHCOO), 169.9 (COOMe), 170.3 (CONH).

**IR:** (neat): 3322 (m), 2978 (m), 1748 (m), 1666 (s), 1518 (s), 1440 (w), 1368 (m), 1246 (w), 1209 (w), 1164 (s), 1031 (w), 985 (w), 945 (w), 861 (w), 783 (w), 655 (w), 584 (w), 465 (w).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for  $C_{10}H_{18}N_2O_5Na$   $[M+Na]^+$ : 269.1108; found 269.1105.

#### 6.2.4.2 2-(2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)acetamido)acetic acid **71**



dipeptide <b>70</b> [542.66]	588 mg	2.39 mmol	1.0 eq
LiOH·H <sub>2</sub> O [41.96]	250 mg	5.98 mmol	2.5 eq

A solution of dipeptide **70** (588 mg, 2.39 mmol) in THF (40 mL) was cooled down to 0 °C and a solution of LiOH·H<sub>2</sub>O (250 mg, 5.98 mmol) in H<sub>2</sub>O (10 mL) was added. The mixture was stirred for 3 h at RT and acidified with 1 M aq. NaHSO<sub>4</sub> (pH 4-5). The organic solvent was removed under reduced pressure and CHCl<sub>3</sub>/*i*PrOH (5:1, 50 mL) and NaHSO<sub>4</sub> (20 mL) were added. The organic layer was separated and the aqueous layer was washed with CHCl<sub>3</sub>/*i*PrOH (5:1, 4x 50 mL). The combined organic layers were washed with brine (30 mL) and dried over MgSO<sub>4</sub>. The solvent was removed under reduced pressure to give acid **71** (520 mg, 3.24 mmol, 94%) as a colorless foam.

**TLC:**  $R_f$  = 0.24 (EtOAc/hexane/HCOOH 5:5:0.1).

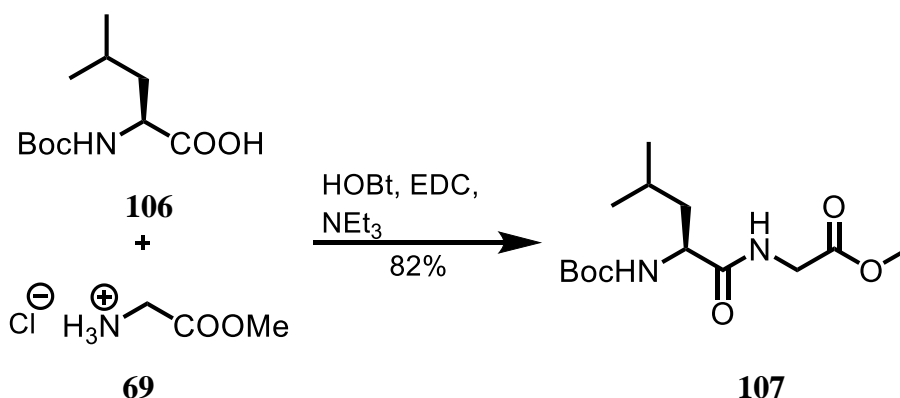
**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 1.38 (s, 9H, *t*Bu), 3.56 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.75 (d,  $J$  = 5.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.00 (t,  $J$  = 5.8 Hz, 1H, NH-Boc), 8.05 (t,  $J$  = 5.7 Hz, 1H, NH).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 28.2 (3C, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 40.6 (CH<sub>2</sub>COO), 43.0 (CH<sub>2</sub>NHBoc), 78.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 155.7 (NHCOO), 169.7 (CONH), 171.2 (COOH).

**IR:** (neat): 3214 (m), 2857 (m), 1787 (m), 1624 (s), 1576 (s), 1487 (w), 1378 (m), 1221 (w), 1201 (w), 1121 (s), 1091 (w), 975 (w), 921 (w), 823 (w), 764 (w), 624 (w), 546 (w), 489 (w).

**HRMS (ESI):** *m/z* calcd for C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>H [M+H]<sup>+</sup>: 233.1137; found 233.1134.

#### 6.2.4.3 *N*-Benzyloxycarbonyl-L-Leucinyl-Glycinemethylester **107**



H-Gly-OMe·HCl <b>69</b> [125.55]	2.31 g	10.0 mmol	1.0 eq
Boc-L-Leu-OH <b>106</b> [231.29]	1.26 g	10.0 mmol	1.0 eq
HOBT [153.13]	2.30 g	15.0 mmol	1.5 eq
triethylamine [101.19; ρ = 0.73]	3.47 mL	25.0 mmol	2.5 eq
EDC [191.70]	2.39 g	12.5 mmol	1.25 eq

A solution of H-Gly-OMe·HCl **69** (2.31 g, 10.0 mmol) and Boc-L-Leu-OH **106** (1.26 g, 10.0 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL) was cooled down to 0 °C. Triethylamine (3.47 mL, 25.0 mmol) and HOBT (2.30 g, 15.0 mmol) were added. The solution was stirred for 10 min at 0 °C and EDC (2.39 g, 12.5 mmol) was added. The solution was allowed to warm up to RT and stirred overnight. The reaction mixture was poured into a mixture of sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> (50 mL) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) and the organic layer was separated. The organic layer was



washed with 1 M NaHCO<sub>3</sub> (50 mL), H<sub>2</sub>O (50 mL) and brine (50 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, the solution was concentrated and pentane was added under heavy stirring. The precipitated solid was collected on a medium porose frit to give dipeptide **107** (2.48 g, 8.2 mmol, 82%) as a colorless solid.

**TLC:**  $R_f = 0.42$  (hexane/EtOAc 1:1).

**m.p.:** 132-133 °C (pentane).

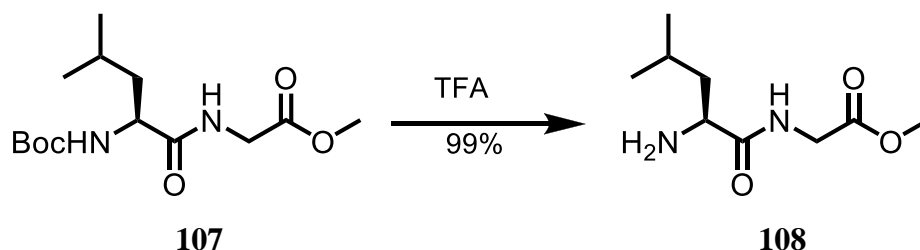
**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 0.94 (q,  $J$  = 3.1 Hz, 6H, 2x Leu-H<sub>δ</sub>), 1.44 (s, 9H, *t*Bu), 1.48 – 1.54 (m, 1H, Leu-H<sub>γ</sub>), 1.64 – 1.74 (m, 2H, Leu-H<sub>β</sub>), 2.75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.04 (d,  $J$  = 5.3 Hz, 2H, Gly-H<sub>α</sub>), 4.16 (s br, 1H, Gly-NH), 4.84 – 4.92 (m, 1H, Leu-H<sub>α</sub>), 6.63 – 6.70 (m, 1H, Leu-NH).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 22.0 (Leu-C<sub>γ</sub>), 23.1 (Leu-C<sub>δa</sub>), 24.9 (Leu-C<sub>δb</sub>), 28.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 40.2 (Leu-C<sub>β</sub>), 41.3 (OCH<sub>3</sub>), 52.5 (Gly-C<sub>α</sub>), 53.1 (Leu-C<sub>α</sub>), 80.4 (CMe<sub>3</sub>), 155.8 (Boc-C=O), 170.3 (Gly-C=O), 172.9 (Leu-C=O).

**spec. rot.:**  $c = 10$ , MeOH,  $\vartheta = 23$  °C  
 $[\alpha]_D = -36.1$ ,  $[\alpha]_{578} = -38.3$ ,  $[\alpha]_{546} = -40.9$ ,  $[\alpha]_{436} = -45.7$ ,  $[\alpha]_{365} = -56.1$ .

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for C<sub>14</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 325.1739; found 325.1743.

#### 6.2.4.4 L-Leucinyl-Glycinemethylester **108**



dipeptide <b>107</b> [302.37]	2.48 g	8.2 mmol	1.0 eq
trifluoroacetic acid [97.02]	50 Vol%		

To a solution of dipeptide **107** (2.48 g, 8.2 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL) trifluoroacetic acid (20 mL) was added at 0 °C. The ice bath was removed and the mixture was stirred for 1 h at RT. Toluene (20 mL) was added and the solvents were coevaporated to give the TFA salt of amine **108** (2.43 g, 8.1 mmol, 99%) as a thick, light yellow oil.

**TLC:**  $R_f = 0.21$  (hexane/EtOAc/ $\text{NH}_3$  5:5:0.1).

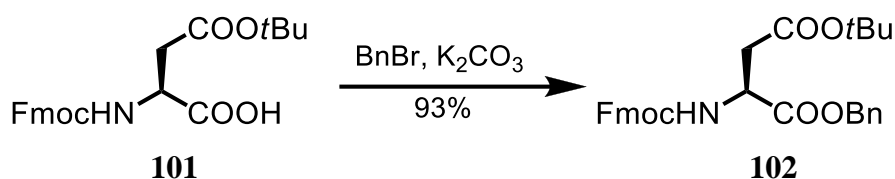
**$^1\text{H}$ -NMR:** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 0.89$  (d,  $J = 4.8$  Hz, 3H, Leu- $\text{H}_{\delta\text{a}}$ ), 0.91 (d,  $J = 4.8$  Hz, 3H, Leu- $\text{H}_{\delta\text{b}}$ ), 1.56 (o,  $J = 6.80$  Hz, 2H, Leu- $\text{H}_{\beta}$ ), 1.71 (sept,  $J = 6.6$  Hz, 1H, Leu- $\text{H}_{\gamma}$ ), 3.64 (s, 3H,  $\text{COOMe}$ ), 3.74 – 3.88 (m, 1H, Leu- $\text{H}_{\alpha}$ ), 3.89 (dq,  $J = 5.8, 27.9$  Hz, 2H, Gly- $\text{H}_{\alpha}$ ), 8.21 (s br, 3H,  $\text{NH}_3$ ), 9.00 (t,  $J = 5.8$  Hz, 1H, Gly-NH).

**$^{13}\text{C}$ -NMR:** (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta = 22.0$  (Leu- $\text{C}_{\delta\text{a}}$ ), 25.5 (Leu- $\text{C}_{\delta\text{b}}$ ), 23.4 (Leu- $\text{C}_{\gamma}$ ), 40.3 (Gly- $\text{C}_{\alpha}$ ), 40.5 (Leu- $\text{C}_{\beta}$ ), 50.7 ( $\text{COOCH}_3$ ), 51.8 (Leu- $\text{C}_{\alpha}$ ), 169.6 (Gly- $\text{C}=\text{O}$ ), 169.7 (Leu- $\text{C}=\text{O}$ ).

**spec. rot.:**  $c = 10$ , MeOH,  $\vartheta = 23$  °C  
 $[\alpha]_{\text{D}} = -31.2$ ,  $[\alpha]_{578} = -34.1$ ,  $[\alpha]_{546} = -36.6$ ,  $[\alpha]_{436} = -40.8$ ,  $[\alpha]_{365} = -50.1$ .

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for  $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 225.1215; found 225.1218.

### 6.2.4.5 (S)-1-Benzyl-4-*tert*-butyl-2-(((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino)succinate **102**



Fmoc-L-Asp( <i>t</i> Bu)-OH <b>101</b> [411.45]	4.11 g	10 mmol	1.0 eq
benzyl bromide [171.03]	3.58 mL	25 mmol	2.5 eq
potassium carbonate [138.21]	2.10 g	30 mmol	3.0 eq

Fmoc-L-Asp(*t*Bu)-OH **101** (4.11 g, 10 mmol) was dissolved in DMF (40 mL). Benzyl bromide (3.58 mL, 25 mmol) and potassium carbonate (2.10 g, 30 mmol) were added. The suspension was stirred at RT for 60 h and the solvent was removed under reduced pressure. The remaining solid was taken up in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (80 mL) and washed with H<sub>2</sub>O (2x 40 mL), sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> (40 mL) and brine (40 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and the solution was concentrated under reduced pressure. Pentane (150 mL) was added under heavy stirring and the precipitated solid was collected on a medium porose frit to give benzyl ester **102** (4.68 g, 9.3 mmol, 93%) as a colorless solid.

**TLC:**  $R_f = 0.38$  (hexane/EtOAc 1:1).

**m.p.:** 66 °C (pentane).

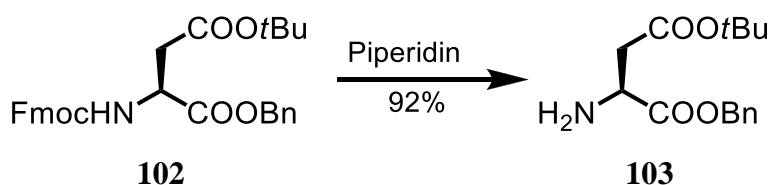
**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 1.44 (s, 9H, *t*Bu), 2.81 (*pseudo*-dd,  $J = 4.5$ , 17.0 Hz, 1H, Asp-H <sub>$\beta$ a</sub>), 2.00 (*pseudo*-dd,  $J = 4.5$ , 17.0 Hz, 1H, Asp-H <sub>$\beta$ b</sub>), 4.32 – 4.47 (m, 3H, Fmoc-CH, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.67 (dt,  $J = 4.4$ , 8.7 Hz, 1H, Asp-H <sub>$\alpha$</sub> ), 5.23, (q,  $J = 11.6$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph), 5.86 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H, NH), 7.29 – 7.37 (m, 5H, Bn-H<sub>Ar</sub>), 7.42 (t,  $J = 7.3$  Hz, 4H, Fmoc-H<sub>Ar</sub>), 7.62 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H, Fmoc-H<sub>Ar</sub>), 7.79 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H, Fmoc-H<sub>Ar</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 28.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 37.8 (Asp-C $\beta$ ), 47.1 (Fmoc-CH), 50.7 (Asp-C $\alpha$ ), 67.3 (CH<sub>2</sub>-Ph), 67.5 (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 81.9 (CMe<sub>3</sub>), 120.0 (C<sub>Ar</sub>), 125.1 (C<sub>Ar</sub>), 127.1 (C<sub>Ar</sub>), 127.7 (C<sub>Ar</sub>), 128.3 (C<sub>Ar</sub>), 128.4 (C<sub>Ar</sub>), 128.6 (C<sub>Ar</sub>), 135.3 (C<sub>Ar</sub>), 141.3 (C<sub>Ar</sub>), 143.7 (C<sub>Ar</sub>), 156.0 (Fmoc-C=O), 169.9 (COOBn), 170.8 (COOtBu).

**spec. rot.:**  $c$  = 10, MeOH,  $\theta$  = 23 °C  
[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = -17.4, [ $\alpha$ ]<sub>578</sub> = -19.3, [ $\alpha$ ]<sub>546</sub> = -24.5, [ $\alpha$ ]<sub>436</sub> = -29.9, [ $\alpha$ ]<sub>365</sub> = -36.1.

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for C<sub>30</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>6</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 524.2049; found 524.2053.

#### 6.2.4.6 (S)-1-Benzyl-4-tert-butyl-2-aminosuccinate **103**



benzyl ester <b>102</b> [411.45]	4.68 g	9.3 mmol	1.0 eq
piperidine [85.15, $\rho$ = 0.86]	20% in DMF		

Benzyl ester **102** (4.68 g, 9.3 mmol) was dissolved in DMF (80 mL) and cooled down to 0 °C. Piperidine (20 mL) was added and the solution was stirred for 30 min until TLC showed complete conversion of the starting material. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (EtOAc/hexane/NH<sub>3</sub> 3:1:0.04) to give amine **103** (2.49 g, 8.6 mmol, 92%) as a colorless solid.

**TLC:**  $R_f$  = 0.78 (hexane/EtOAc/NH<sub>3</sub> 5:5:0.1).

**m.p.:** 112 °C.

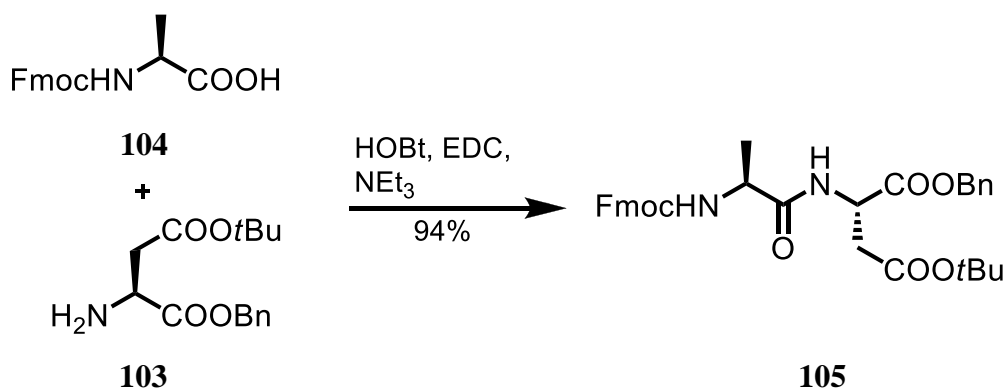
**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 1.44 (s, 9H, *t*Bu), 1.99 (d,  $J$  = 10.6 Hz, 2H, NH<sub>2</sub>), 2.69 (*pseudo*-dd,  $J$  = 6.6, 16.6 Hz, 1H, Asp-H <sub>$\beta$ a</sub>), 2.71 (*pseudo*-dd,  $J$  = 5.0, 16.7 Hz, 1H, Asp-H <sub>$\beta$ b</sub>), 3.82 (dd,  $J$  = 4.9, 6.6 Hz, 1H, Asp-H <sub>$\alpha$</sub> ), 5.16 (*pseudo*-d,  $J$  = 12.1 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub>-Ph), 5.21 (*pseudo*-d,  $J$  = 12.3 Hz, 1H, CH<sub>2b</sub>-Ph), 7.34 – 7.42 (m, 5H, H<sub>Ar</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 28.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 40.1 (Asp-C <sub>$\beta$</sub> ), 51.6 (Asp-C <sub>$\alpha$</sub> ), 67.1 (Bn-CH<sub>2</sub>), 81.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 128.4 (2x Bn-C<sub>Ar</sub>), 128.5 (Bn-C<sub>Ar</sub>), 128.7 (2x Bn-C<sub>Ar</sub>), 135.7 (Bn-C<sub>Ar</sub>), 170.4 (COO*t*Bu), 174.4 (COOBn).

**spec. rot.:**  $c$  = 10, MeOH,  $\vartheta$  = 23 °C  
 $[\alpha]_D$  = -14.3,  $[\alpha]_{578}$  = -15.2,  $[\alpha]_{546}$  = -17.5,  $[\alpha]_{436}$  = -20.1,  $[\alpha]_{365}$  = -24.2.

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 280.1549; found 280.1550.

#### 6.2.4.7 *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-Alaninyl-L-*O*-*tert*-butyl-Aspartate-benzylester **105**



Fmoc-L-Ala-OH <b>104</b> [311.33]	2.14 g	6.87 mmol	1.0 eq
H-L-Asp-OBn <b>103</b> [279.33]	1.92 g	6.87 mmol	1.0 eq
HOBT [153.13]	1.58 g	10.3 mmol	1.5 eq
triethylamine [101.19; $\rho$ = 0.73]	1.43 mL	10.3 mmol	1.5 eq
EDC [191.70]	1.64 g	8.59 mmol	1.25 eq

---

A solution of Fmoc-L-Ala-OH **104** (2.14 g, 6.87 mmol) and H-L-Asp-OBn **103** (1.92 g, 6.87 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (60 mL) was cooled down to 0 °C and triethylamine (1.43 mL, 10.3 mmol) and HOBt (1.58 g, 10.3 mmol) were added. The solution was stirred for 10 min at 0 °C and EDC (1.64 g, 8.59 mmol) was added. The solution was allowed to warm up to RT and stirred overnight. The reaction mixture was poured into a mixture of sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> (35 mL) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 mL) and the organic layer was separated. The organic layer was washed with 1 M NaHCO<sub>3</sub> (35 mL), H<sub>2</sub>O (35 mL) and brine (35 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, the solvent was removed under reduced pressure and the remaining solid was purified by flash column chromatography on silica gel (EtOAc/pentane 3:1) to give dipeptide **105** (3.70 g, 6.46 mmol, 94%) as a colorless solid.

**TLC:**  $R_f$  = 0.54 (hexane/EtOAc 1:1).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 1.36 – 1.41 (m, 12H, *t*Bu, Ala-H <sub>$\beta$</sub> ), 2.73 (*pseudo*-dd,  $J$  = 4.4, 17.1 Hz, 1H, Asp-H <sub>$\beta$ a</sub>), 2.99 (*pseudo*-dd,  $J$  = 4.4, 17.2 Hz, 1H, Asp-H <sub>$\beta$ b</sub>), 4.21 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 1H, Fmoc-CH), 4.27 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 1H, Ala-H <sub>$\alpha$</sub> ), 4.37 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.86 (dt,  $J$  = 4.2, 8.3 Hz, 1H, Asp-H <sub>$\alpha$</sub> ), 5.13 (*pseudo*-d,  $J$  = 12.1 Hz, 1H, Bn-CH<sub>2a</sub>), 5.21 (*pseudo*-d,  $J$  = 12.3 Hz, 1H, Bn-CH<sub>2b</sub>), 5.47 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 1H, CONH), 6.90 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H, OOCNH), 7.28 – 7.33 (m, 7H, Bn-H<sub>Ar</sub>, Fmoc-H<sub>Ar</sub>), 7.40 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H, Fmoc-H<sub>Ar</sub>), 7.59 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 2H, Fmoc-H<sub>Ar</sub>), 7.76 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 2H, Fmoc-H<sub>Ar</sub>).

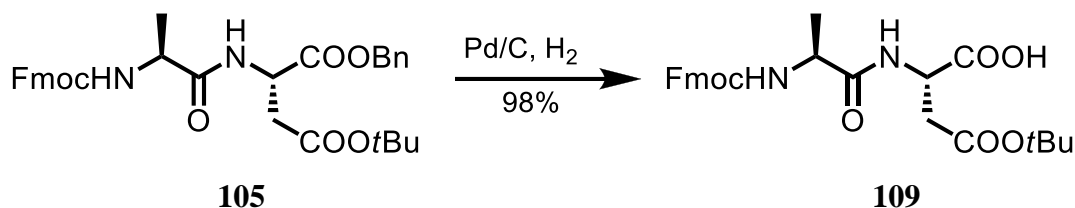
**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 19.1 (Ala-C <sub>$\beta$</sub> ), 28.1 (C(CH<sub>3</sub>)), 37.3 (Asp-C <sub>$\beta$</sub> ), 47.3 (Fmoc-CH), 48.9 (Ala-C <sub>$\alpha$</sub> ), 50.6 (Asp-C <sub>$\alpha$</sub> ), 67.2 (Ph-CH<sub>2</sub>), 67.7 (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 82.1 (C(CH<sub>3</sub>)), 120.1 (Fmoc-C<sub>Ar</sub>), 125.2 (Fmoc-C<sub>Ar</sub>), 127.2 (Fmoc-C<sub>Ar</sub>), 127.8 (Fmoc-C<sub>Ar</sub>), 128.4 (Bn-C<sub>Ar</sub>), 128.6 (Bn-C<sub>Ar</sub>), 128.7 (Bn-C<sub>Ar</sub>), 135.3 (Bn-C<sub>Ar,q</sub>), 141.4 (Fmoc-C<sub>Ar,q</sub>), 144.0 (Fmoc-C<sub>Ar,q</sub>), 155.9 (Fmoc-C=O), 170.2 ( $\alpha$ -Asp-C=O), 170.5 (Ala-C=O), 172.2 ( $\beta$ -Asp-C=O).

**spec. rot.:**  $c$  = 10, MeOH,  $\theta$  = 23 °C

$[\alpha]_D$  = +9.1,  $[\alpha]_{578}$  = +10.5,  $[\alpha]_{546}$  = +12.0,  $[\alpha]_{436}$  = +16.4,  
 $[\alpha]_{365}$  = +20.2.

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for  $C_{33}H_{37}N_2O_7$   $[M+H]^+$ : 573.2601; found 573.2597.

#### 6.2.4.8 *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-Alaninyl-*O*-*tert*-butyl-L-Aspartic acid **109**



dipeptide <b>105</b> [411.45]	3.70 g	6.46 mmol	1.0 eq
palladium on carbon [10% w/w]	0.69 g	0.65 mmol	0.1 eq

In a solution of dipeptide **105** (3.70 g, 6.46 mmol) in MeOH (70 mL) palladium on carbon (10% w/w, 0.69 g, 0.65 mmol) was suspended. The reaction was flushed with hydrogen and stirred under a hydrogen atmosphere for 2 h. The suspension was filtered over a short plug of celite and the filtrate was concentrated to dryness under vacuum to give acid **109** (3.05 g, 6.33 mmol, 98%) as a colorless foam.

**TLC:**  $R_f$  = 0.54 (hexane/EtOAc 1:1).

**$^1\text{H-NMR}$ :** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 1.40 (s, 12H, *t*Bu, Ala- $\text{H}_\beta$ ), 2.79 (dd,  $J$  = 4.6, 17.1 Hz, 1H, Asp- $\text{H}_{\beta a}$ ), 2.95 (dd,  $J$  = 4.7, 17.0 Hz, 1H, Asp- $\text{H}_{\beta b}$ ), 4.17 – 4.21 (m, 1H, Fmoc-CH), 4.33 – 4.36 (m, 3H, Fmoc- $\text{CH}_2$ , Ala- $\text{H}_\alpha$ ), 4.80 – 4.82 (m, 1H, Asp- $\text{H}_\alpha$ ), 5.89 (d,  $J$  = 5.9 Hz, 1H, Ala-NH), 7.27 – 7.41 (m, 5H, 4x Fmoc- $\text{CH}_{\text{Ar}}$ , Asp-NH), 7.57 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 2H, 2x Fmoc- $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 7.74 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 2H, 2x Fmoc- $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 9.80 (s br, 1H, COOH).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 18.9 (Ala- $\text{C}_\beta$ ), 28.1 (3C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 37.2 (Asp- $\text{C}_\beta$ ), 47.2 (Fmoc-CH), 49.1 (Ala- $\text{C}_\alpha$ ), 50.5 (Asp- $\text{C}_\alpha$ ), 67.3 (Fmoc- $\text{CH}_2$ ), 82.3 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 120.1 (Fmoc- $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 125.2 (Fmoc- $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 127.2 (Fmoc- $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 127.8 (Fmoc- $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 141.4 (Fmoc- $\text{C}_{\text{q,Ar}}$ ), 143.9 (Fmoc- $\text{C}_{\text{q,Ar}}$ ).

---

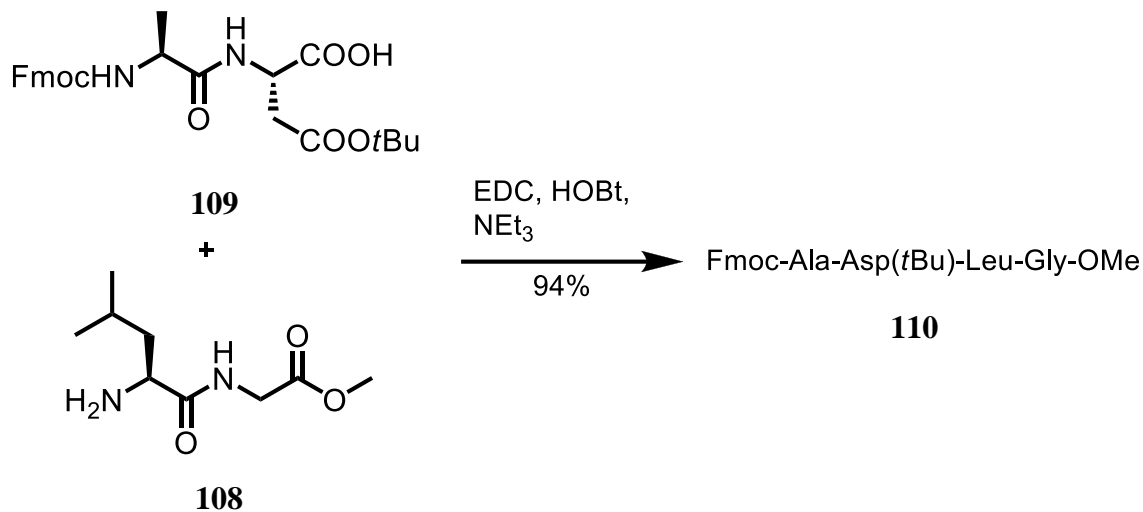
156.2 (Fmoc-C=O), 170.6 (Ala-C=O), 172.9 ( $\alpha$ -Asp-C=O), 174.2 ( $\beta$ -Asp-C=O).

**IR:** (neat): 3320 (w, br), 2981 (w), 2940 (w), 1270 (s), 1667 (s), 1525 (m), 1450 (m), 1416 (w), 1369 (m), 1321 (w), 1248 (s), 1154 (s), 1074 (m), 1039 (m), 974 (w), 910 (m), 845 (w), 735 (s), 646 (w), 620 (w), 583 (w), 544 (w), 428 (w).

**spec. rot.:**  $c = 10$ , MeOH,  $\vartheta = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$   
 $[\alpha]_{\text{D}} = +8.3$ ,  $[\alpha]_{578} = +9.4$ ,  $[\alpha]_{546} = +10.9$ ,  $[\alpha]_{436} = +12.9$ ,  $[\alpha]_{365} = +19.4$ .

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_7\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 505.1945; found 505.1944.

#### 6.2.4.9 *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-Alaninyl-*O*-tert-butyl-L-Aspartateyl-L-Leucinyl-Glycinemethylester **110**



acid <b>109</b> [482.21]	2.96 g	6.13 mmol	1.0 eq
amine·TFA <b>108</b> [202.25]	1.77 g	8.76 mmol	1.4 eq
HOBT [153.13]	1.41 g	9.20 mmol	1.5 eq
triethylamine [101.19; $\rho = 0.73$ ]	2.12 mL	15.3 mmol	2.5 eq
EDC [191.70]	1.47 g	7.67 mmol	1.25 eq



A solution of acid **109** (2.96 g, 6.13 mmol) and amine-TFA **108** (1.77 g, 8.76 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) was cooled down to 0 °C. Triethylamine (2.12 mL, 15.3 mmol) and HOBT (1.41 g, 9.20 mmol) were added. The solution was stirred for 15 min at 0 °C and EDC (1.47 g, 7.67 mmol) was added. The solution was allowed to warm up to RT and stirred overnight. The reaction mixture was poured into a mixture of sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> (35 mL) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (35 mL) and the organic layer was separated. The organic layer was washed with 1 M NaHCO<sub>3</sub> (35 mL), H<sub>2</sub>O (35 mL) and brine (35 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, the solvent was removed under reduced pressure and the remaining solid was purified by flash column chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 100:2) to give tetrapeptide **110** (4.40 g, 5.76 mmol, 94%) as a amorphous, colorless solid.

**TLC:**  $R_f$  = 0.62 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 0.84 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 6H, 2x Leu-H<sub>δ</sub>), 1.36 (s, 9H, Asp-*t*Bu), 1.41 – 1.44 (m, 3H, Ala-H<sub>β</sub>), 1.61 – 1.83 (m, 3H, Leu-H<sub>γ</sub>, Leu-H<sub>β</sub>), 2.65 (dd,  $J$  = 6.5, 17.0 Hz, 1H, Asp-H<sub>βa</sub>), 2.94 (dd,  $J$  = 4.1, 17.0 Hz, 1H, Asp-H<sub>βb</sub>), 3.69 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.90 (dd,  $J$  = 5.3, 18.0 Hz, 1H, Gly-H<sub>αa</sub>), 4.07 (dd,  $J$  = 5.9, 18.0 Hz, 1H, Gly-H<sub>αb</sub>), 4.20 – 4.24 (m, 2H, Leu-H<sub>α</sub>, Fmoc-CH), 4.37 – 4.55 (m, 3H, Fmoc-CH<sub>2</sub>, Ala-H<sub>α</sub>), 4.62 – 4.68 (m, 1H, Leu-H<sub>α</sub>), 5.44 (d,  $J$  = 5.3 Hz, 1H, Ala-NH), 7.08 (t,  $J$  = 5.2 Hz, 1H, Gly-NH), 7.24 (s, 1H, Leu-NH), 7.30 (dt,  $J$  = 1.0, 7.5 Hz, 2H, 2x Fmoc-CH<sub>Ar</sub>), 7.40 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H, 2x Fmoc-CH<sub>Ar</sub>), 7.58 (dd,  $J$  = 3.0, 7.1 Hz, 2H, 2x Fmoc-CH<sub>Ar</sub>), 7.70 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H, Asp-NH), 7.76 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2H, 2x Fmoc-CH<sub>Ar</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 18.2 (Leu-C<sub>γ</sub>), 21.5 (Leu-C<sub>δa</sub>), 23.3 (Leu-C<sub>δb</sub>), 24.8 (Ala-C<sub>β</sub>), 28.0 (3C, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 36.1 (Asp-C<sub>β</sub>), 40.3 (Gly-C<sub>α</sub>), 41.2 (Leu-C<sub>β</sub>), 47.1 (Fmoc-CH), 50.3 (COOCH<sub>3</sub>), 51.6 (Asp-C<sub>α</sub>), 52.1 (Ala-C<sub>α</sub>), 52.3 (Leu-C<sub>α</sub>), 67.6 (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 82.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 120.2 (2C, Fmoc-C<sub>Ar</sub>H), 125.1 (2C, Fmoc-C<sub>Ar</sub>H), 127.2 (2C, Fmoc-C<sub>Ar</sub>H), 128.0 (2C, Fmoc-C<sub>Ar</sub>H), 141.5 (2C, Fmoc-C<sub>Ar</sub>), 143.8 (2C, Fmoc-C<sub>Ar</sub>), 156.7 (Fmoc-C=O), 170.2 (Gly-C=O), 170.5 (Asp-COO*t*Bu), 171.5 (Asp-CONH), 172.4 (Leu-C=O), 173.0 (Ala-C=O).

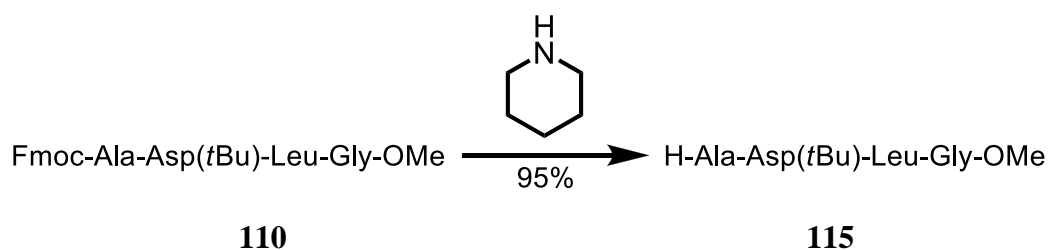
---

**IR:** (neat): 3212 (m, br), 3125 (w), 3047 (w), 2930 (m), 1771 (m), 1633 (s), 1546 (s), 1421 (m), 1332 (m), 1278 (w), 1235 (m), 1200 (m), 1174 (s), 1056 (w), 1021 (w), 898 (w), 817 (w), 765 (s), 714 (w), 652 (w), 538 (w), 501 (w).

**spec. rot.:**  $c = 10$ , MeOH,  $\vartheta = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$   
 $[\alpha]_{\text{D}} = -30.7$ ,  $[\alpha]_{578} = -36.4$ ,  $[\alpha]_{546} = -42.6$ ,  $[\alpha]_{436} = -48.4$ ,  $[\alpha]_{365} = -57.6$ .

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{35}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_9\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 689.3157; found 689.3152.

#### 6.2.4.10 L-Alaninyl-*O*-tert-butyl-L-Aspartateyl-L-Leuciny-Glycinemethylester **115**



tetrapeptide **109** [666.76] 4.40 g 5.76 mmol 1.0 eq  
piperidine [85.15,  $\rho = 0.86$ ] 20% in DMF

Tetrapeptide **110** (4.40 g, 5.76 mmol) was dissolved in DMF (50 mL) and cooled down to  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Piperidine (12.5 mL) was added and the solution was stirred for 25 min until TLC showed complete conversion of the starting material. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by flash column chromatography on silica gel ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$  100:2:1) to give amine **115** (2.43 g, 5.47 mmol, 95%) as a colorless foam.

**TLC:**  $R_f = 0.34$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$  10:1:0.1).

**$^1\text{H}$ -NMR:** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 0.83$  (d,  $J = 6.2$  Hz, 2H, Leu- $\text{H}_{\delta\text{a}}$ ), 0.86 (d,  $J = 6.2$  Hz, 2H, Leu- $\text{H}_{\delta\text{b}}$ ), 1.27 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H, Ala- $\text{H}_{\beta}$ ), 1.43 (s, 9H, *t*Bu), 1.48 – 1.68 (m, 1H, Leu- $\text{H}_{\gamma}$ ), 1.74 – 1.82 (m, 2H, Leu- $\text{H}_{\beta}$ ), 2.75 –

---

2.78 (m, 2H, Asp-H $\beta$ ), 3.53 (q,  $J = 7.0$  Hz, 1H, Ala-H $\alpha$ ), 3.72 (s, 3H, COOCH $_3$ ), 3.90 (*pseudo*-dd,  $J = 5.4, 18.0$  Hz, 1H, Gly-H $_{\alpha\alpha}$ ), 3.90 (*pseudo*-dd,  $J = 5.9, 17.9$  Hz, 1H, Gly-H $_{\alpha\beta}$ ), 4.41 – 4.48 (m, 1H, Leu-H $\alpha$ ), 4.65 – 4.72 (m, 1H, Asp-H $\alpha$ ), 6.92 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, NH), 7.00 (d,  $J = 4.9$  Hz, 1H, NH), 8.21 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H, NH).

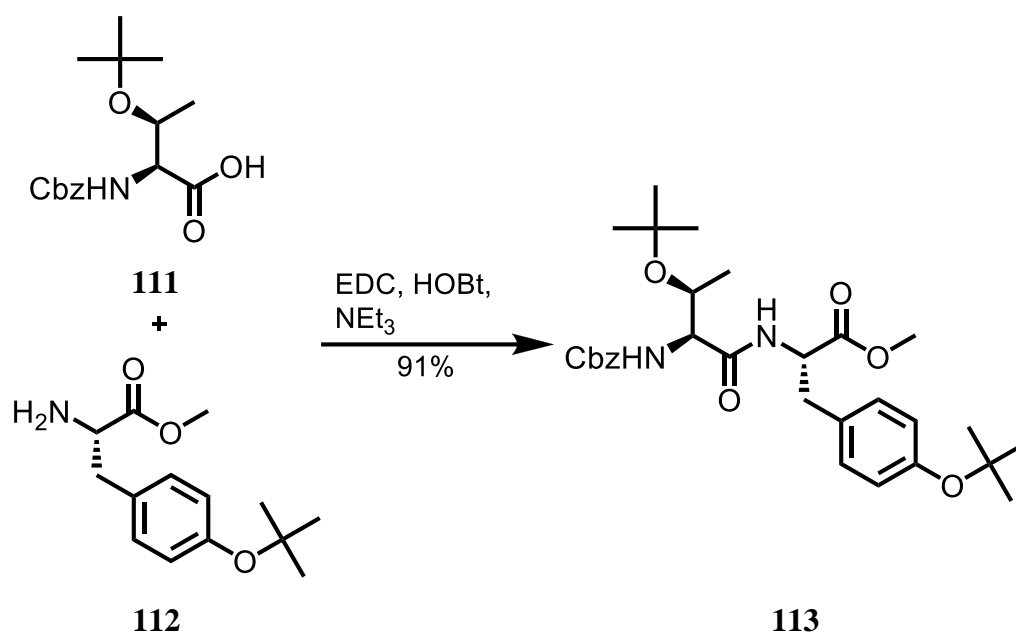
**$^{13}\text{C}$ -NMR:** (75 MHz, CDCl $_3$ )  $\delta = 21.6$  (Ala-C $\beta$ ), 21.8 (Leu-C $_{\delta\alpha}$ ), 23.1 (Leu-C $_{\delta\beta}$ ), 24.9 (Leu-C $\gamma$ ), 28.2 (C(CH $_3$ ) $_3$ ), 37.0 (Asp-C $\beta$ ), 40.4 (Gly-C $\alpha$ ), 41.3 (Leu-C $\beta$ ), 49.7 (Ala-C $\alpha$ ), 50.8 (COOCH $_3$ ), 52.1 (Asp-C $\alpha$ ), 52.4 (Leu-C $\alpha$ ), 82.1 (C(CH $_3$ ) $_3$ ), 170.3 (COOMe), 171.0 (Asp-COO*t*Bu), 171.1 (Asp-CONH), 172.1 (Leu-C=O), 176.4 (Ala-C=O).

**IR:** (neat): 3295 (m, br), 3065 (w), 2959 (m), 1710 (m), 1649 (s), 1529 (s), 1447 (m), 1368 (m), 1294 (w), 1253 (m), 1210 (m), 1154 (s), 1078 (w), 1032 (w), 844 (w), 800 (w), 735 (s), 701 (w), 620 (w), 570 (w), 541 (w).

**spec. rot.:**  $c = 10$ , MeOH,  $\vartheta = 23$  °C  
 $[\alpha]_{\text{D}} = -35.2$ ,  $[\alpha]_{578} = -39.7$ ,  $[\alpha]_{546} = -49.3$ ,  $[\alpha]_{436} = -57.4$ ,  $[\alpha]_{365} = -66.4$ .

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for C $_{20}$ H $_{37}$ N $_4$ O $_7$  [M+H] $^+$ : 445.2657; found 445.2659.

**6.2.4.11 *N*-Benzyloxycarbonyl-*O*-*tert*-butyl-L-Theroninyl-*O*-*tert*-butyl-L-Tyrosine methylester **113****



acid·DCHA <b>111</b> [490.68]	2.50 g	5.04 mmol	1.0 eq
amine·HCl <b>112</b> [287.78]	1.47 g	5.04 mmol	1.0 eq
HOBt [153.13]	1.17 g	7.64 mmol	1.5 eq
triethylamine [101.19; $\rho = 0.73$ ]	1.76 mL	12.7 mmol	2.5 eq
EDC [191.70]	1.22 g	6.37 mmol	1.25 eq

A solution of acid·DCHA **111** (2.50 g, 5.04 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 mL) was washed with 1 M aq.  $\text{NaHSO}_4$  (2x 15 mL) and brine (10 mL) and the combined organic layers were dried over  $\text{MgSO}_4$ . The solvent was removed under reduced pressure and taken up in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL). To this solution amine·HCl **112** (1.47 g, 5.04 mmol) was added and cooled down to 0 °C. Triethylamine (1.76 mL, 12.7 mmol) and HOBt (1.17 g, 7.64 mmol) were added. The solution was stirred for 15 min at 0 °C and EDC (1.22 g, 6.37 mmol) was added. The solution was allowed to warm up to RT and stirred overnight. The reaction mixture was poured into a mixture of sat. aq.  $\text{NaHCO}_3$  (30 mL) and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 mL) and the organic layer was separated. The organic layer was washed with 1 M  $\text{NaHCO}_3$  (30 mL),  $\text{H}_2\text{O}$  (30 mL) and brine (30 mL). The combined organic layers were dried over  $\text{MgSO}_4$ , the solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by flash column chromatography

on silica gel (EtOAc/hexane 1:3) to give dipeptide **113** (2.50 g, 4.61 mmol, 91%) as a colorless foam.

**TLC:**  $R_f = 0.42$  (EtOAc/hexane 1:1).

**$^1\text{H-NMR}$ :** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 1.05$  (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H, Thr- $\text{H}_\gamma$ ), 1.21 (s, 9H, Thr-*t*Bu), 1.31 (s, 9H, Tyr-*t*Bu), 3.02 (dd,  $J = 6.4, 14.0$  Hz, 1H, Tyr- $\text{H}_{\beta\text{a}}$ ), 3.09 (dd,  $J = 5.7, 14.0$  Hz, 1H, Tyr- $\text{H}_{\beta\text{b}}$ ), 3.69 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ ), 4.08 – 4.18 (m, 2H, Tyr- $\text{H}_\alpha$ , Thr- $\text{H}_\beta$ ), 4.82 (q,  $J = 6.5$  Hz, 1H, Thr- $\text{H}_\alpha$ ), 5.05 – 5.16 (m, 2H, Cbz- $\text{CH}_2$ ), 5.94 (d,  $J = 4.2$  Hz, 1H, Tyr-NH), 6.89 – 6.92 (m, 2H, 2x Tyr- $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 6.98 – 7.01 (m, 2H, 2x Tyr- $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 7.30 – 7.37 (m, 5H, Cbz- $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 7.71 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H, Thr-NH).

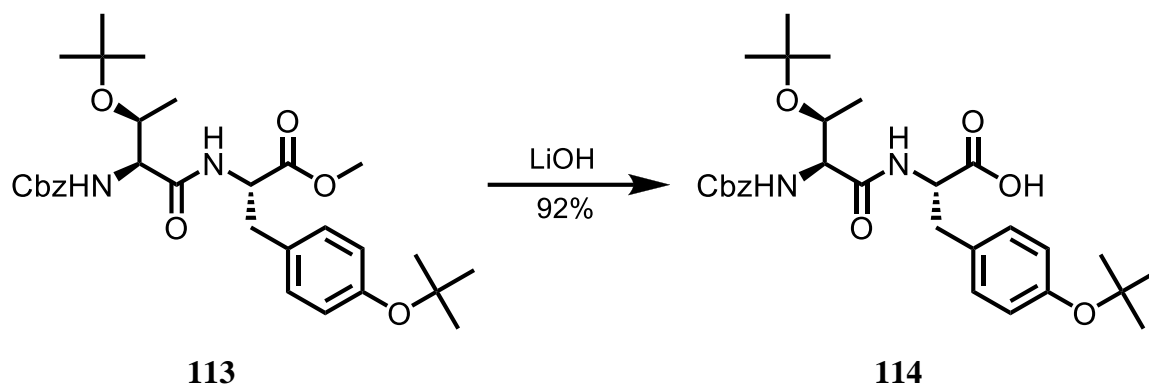
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 16.6$  (Thr- $\text{C}_\gamma$ ), 28.2 (3C, Tyr- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 29.0 (3C, Thr- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 37.5 (Tyr- $\text{C}_\beta$ ), 52.3 ( $\text{COOCH}_3$ ), 53.6 (Tyr- $\text{C}_\alpha$ ), 58.6 (Thr- $\text{C}_\alpha$ ), 66.9 (Cbz- $\text{CH}_2$ ), 67.0 (Thr- $\text{C}_\beta$ ), 75.6 (Thr- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 78.5 (Tyr- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 124.3 (2C, Tyr- $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 128.1 (2C, Cbz- $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 128.3 (Tyr- $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.7 (2C, Cbz- $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 129.7 (2C, Tyr- $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 130.8 (Cbz- $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 136.4 (Cbz- $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 154.7 (Tyr- $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 156.2 (Cbz- $\text{C}=\text{O}$ ), 169.2 (Tyr- $\text{C}=\text{O}$ ), 171.7 (Thr- $\text{C}=\text{O}$ ).

**IR:** (neat): 3325 (m), 3033 (w), 2975 (m), 1722 (s), 1673 (s), 1609 (w), 1488 (s), 1364 (s), 1309 (w), 1234 (w), 1210 (w), 1165 (s), 1116 (w), 1085 (m), 1045 (m), 990 (w), 897 (m), 857 (w), 776 (w), 740 (m), 699 (m), 591 (w), 503 (w), 479 (w).

**spec. rot.:**  $c = 10$ , MeOH,  $\vartheta = 23$  °C  
 $[\alpha]_{\text{D}} = -19.3$ ,  $[\alpha]_{578} = -24.7$ ,  $[\alpha]_{546} = -30.4$ ,  $[\alpha]_{436} = -36.7$ ,  $[\alpha]_{365} = -44.8$ .

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_7\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 565.2884; found 565.2879.

#### 6.2.4.12 *N*-Benzyloxycarbonyl-*O*-*tert*-butyl-L-Theroninyl-*O*-*tert*-butyl-L-Tyrosine **114**



dipeptide <b>113</b> [542.66]	2.32 g	4.28 mmol	1.0 eq
LiOH·H <sub>2</sub> O [41.96]	449 mg	10.7 mmol	2.5 eq

A solution of dipeptide **113** (2.32 g, 4.28 mmol) in THF (80 mL) was cooled down to 0 °C and a solution of LiOH·H<sub>2</sub>O (449 mg, 10.7 mmol) in H<sub>2</sub>O (20 mL) was added. The mixture was stirred for 3 h at RT and acidified with 1 M aq. NaHSO<sub>4</sub> (pH 4-5). The organic solvent was removed under reduced pressure and CHCl<sub>3</sub>/*i*PrOH (5:1, 50 mL) and NaHSO<sub>4</sub> (20 mL) were added. The organic layer was separated and the aqueous layer was washed with CHCl<sub>3</sub>/*i*PrOH (5:1, 4x 50 mL). The combined organic layers were washed with brine (30 mL) and dried over MgSO<sub>4</sub>. The solvent was removed under reduced pressure to give acid **114** (2.08 g, 3.94 mmol, 92%) as a colorless foam.

**TLC:**  $R_f$  = 0.12 (EtOAc/hexane/HCOOH 5:5:0.1).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 1.03 (d,  $J$  = 6.2 Hz, 3H, Thr-H<sub>γ</sub>), 1.18 (s, 9H, Thr-*t*Bu), 1.31 (s, 9H, Tyr-*t*Bu), 3.03 (dd,  $J$  = 6.8, 14.0 Hz, 1H, Tyr-H<sub>βa</sub>), 3.18 (dd,  $J$  = 5.2, 14.1 Hz, 1H, Tyr-H<sub>βb</sub>), 4.08 – 4.13 (m, 2H, Thr-H<sub>α</sub>, Thr-H<sub>β</sub>), 4.83 (q,  $J$  = 6.2 Hz, 1H, Tyr-H<sub>α</sub>), 5.05 – 5.16 (m, 2H, Cbz-CH<sub>2</sub>), 5.96 (d,  $J$  = 4.7 Hz, 1H, Thr-NH), 6.91 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H, Tyr-CH<sub>Ar</sub>), 7.05 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H, Tyr-CH<sub>Ar</sub>), 7.33 – 7.36 (m, 5H, Cbz-CH<sub>Ar</sub>), 7.66 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 1H, Tyr-NH), 8.37 (s br, 1H, COOH).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 16.6 (Thr-C<sub>γ</sub>), 28.2 (3C, Tyr-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.0 (Thr-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 37.0 (Tyr-C<sub>β</sub>), 53.5 (Tyr-C<sub>α</sub>), 58.6 (Thr-C<sub>α</sub>), 66.9 (Cbz-

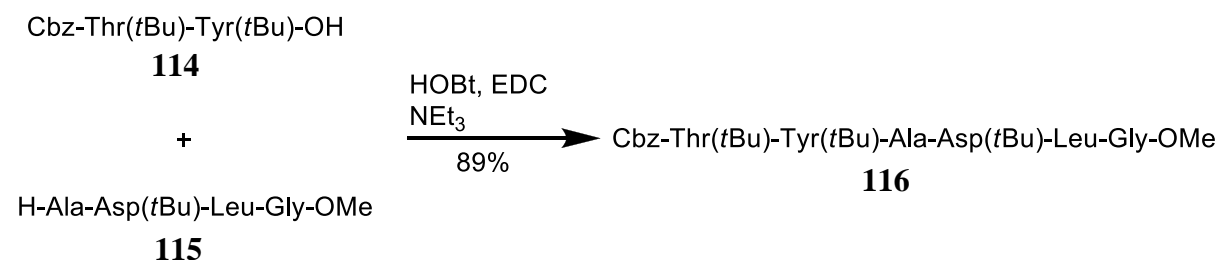
CH<sub>2</sub>), 67.0 (Thr-C<sub>β</sub>), 75.7 (Thr-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 78.6 (Tyr-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 124.4 (2C, Tyr-CH<sub>Ar</sub>), 128.1 (Cbz-CH<sub>Ar</sub>), 128.3 (Tyr-C<sub>Ar</sub>), 128.7 (2C, Cbz-CH<sub>Ar</sub>), 130.0 (2C, Cbz-CH<sub>Ar</sub>), 130.6 (2C, Tyr-CH<sub>Ar</sub>), 136.3 (Cbz-C<sub>Ar</sub>), 154.7 (Tyr-C<sub>Ar</sub>O), 156.2 (Cbz-C=O), 169.6 (Thr-C=O), 175.4 (Tyr-C=O).

**IR:** (neat): 3313 (w br), 3034 (m), 2975 (w), 2935 (w), 1722 (s), 1669 (s), 1502 (s), 1389 (w), 1366 (m), 1308 (w), 1235 (s), 1165 (s), 1113 (w), 1087 (m), 1047 (m), 991 (w), 899 (m), 853 (w), 776 (w), 734 (s), 698 (m), 647 (w), 598 (w), 566 (w), 502 (w), 479 (w).

**spec. rot.:** c = 10, MeOH, θ = 23 °C  
 [α]<sub>D</sub> = -18.7, [α]<sub>578</sub> = -24.1, [α]<sub>546</sub> = -29.5, [α]<sub>436</sub> = -35.8, [α]<sub>365</sub> = -42.9.

**HRMS (ESI):** m/z calcd for C<sub>29</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 551.2728; found 551.2720.

#### 6.2.4.13 *N*-Benzyloxycarbonyl-*O*-*tert*-butyl-L-Threoninyl-*O*-*tert*-butyl-L-Tyrosinyl-L-Alaninyl-*O*-*tert*-butyl-L-Aspartate-L-Leucinyl-Glycinemethylester **116**



dipeptide <b>114</b> [528.65]	1.18 g	2.25 mmol	1.0 eq
tetrapeptide <b>115</b> [444.52]	1.00 g	2.25 mmol	1.0 eq
HOBt [153.13]	0.52 g	3.38 mmol	1.5 eq
triethylamine [101.19; ρ = 0.73]	0.47 mL	3.38 mmol	1.5 eq
EDC [191.70]	0.54 g	2.81 mmol	1.25 eq

A solution of dipeptide **114** (1.18 g, 2.25 mmol) and tetrapeptide **115** (1.00 g, 2.25 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) was cooled down to 0 °C and triethylamine (0.47 mL, 3.38 mmol) and HOBt

---

(0.82 g, 3.38 mmol) were added. The solution was stirred for 15 min at 0 °C and EDC (0.54 g, 2.81 mmol) was added. The solution was allowed to warm up to RT and stirred overnight. The reaction mixture was poured into a mixture of sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> (15 mL) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) and the organic layer was separated. The organic layer was washed with 1 M NaHCO<sub>3</sub> (15 mL), H<sub>2</sub>O (15 mL) and brine (15 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, the solvent was removed under reduced pressure and the remaining solid was purified by flash column chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 100:2) to give hexapeptide **116** (1.91 g, 2.00 mmol, 89%) as a colorless solid.

**TLC:**  $R_f$  = 0.20 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 0.88 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 3H, Leu-H <sub>$\delta$ a), 0.94 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 3H, Leu-H <sub>$\delta$ b), 1.05 (s, 9H, Thr-*t*Bu), 1.11 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 3H, Thr-H <sub>$\gamma$</sub> ), 1.33 (s, 9H, Asp-*t*Bu), 1.36 – 1.42 (m, 12H, Tyr-*t*Bu, Ala-H <sub>$\beta$</sub> ), 1.69 – 1.72 (m, 1H, Leu-H <sub>$\gamma$</sub> ), 1.81 – 1.84 (m, 2H, Leu-H <sub>$\beta$</sub> ), 2.80 (*pseudo*-dd,  $J$  = 8.5, 15.9 Hz, 1H, Asp-H <sub>$\beta$ a), 2.87 – 2.95 (m, 2H, Asp-H <sub>$\beta$ b, Tyr-H <sub>$\beta$ a), 3.09 (*pseudo*-dd,  $J$  = 4.5, 14.4 Hz, 1H, Tyr-H <sub>$\beta$ b), 3.72 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.93 (*pseudo*-dd,  $J$  = 5.4, 17.9 Hz, 1H, Gly-H <sub>$\alpha$ a), 4.03 – 4.04 (m, 1H, Thr-H <sub>$\beta$</sub> ), 4.10 (*pseudo*-dd,  $J$  = 6.2, 17.4 Hz, 1H, Gly-H <sub>$\alpha$ b</sub>, Thr-H <sub>$\alpha$</sub> ), 4.22 – 4.27 (m, 1H, Ala-H <sub>$\alpha$</sub> ), 4.40 – 4.43 (m, 1H, Tyr-H <sub>$\alpha$</sub> ), 4.46 – 4.51 (m, 1H, Leu-H <sub>$\alpha$</sub> ), 4.67 – 4.71 (m, 1H, Asp-H <sub>$\alpha$</sub> ), 5.03 – 5.10 (m, 2H, Bn-CH<sub>2</sub>), 5.94 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 1H, Cbz-NH), 6.75 (d,  $J$  = 5.2 Hz, 1H, Tyr-NH), 6.87 (d,  $J$  = 4.9 Hz, 1H, Ala-NH), 6.94 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H, Tyr-H<sub>Ar</sub>), 7.00 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H, Tyr-H<sub>Ar</sub>), 7.08 (t,  $J$  = 5.3 Hz, 1H, Gly-NH), 7.17 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H, Leu-NH), 7.33 – 7.39 (m, 6H, Cbz-H<sub>Ar</sub>, Asp-NH).</sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub>

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 17.0 (Ala-C <sub>$\beta$</sub> ), 19.2 (Thr-C <sub>$\gamma$</sub> ), 21.3 (Leu-C <sub>$\delta$ a), 23.5 (Leu-C <sub>$\delta$ b), 24.9 (Leu-C <sub>$\gamma$</sub> ), 28.1 (Tyr-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.2 (Thr-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.0 (Asp-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 36.0 (Tyr-C <sub>$\beta$</sub> ), 36.9 (Asp-C <sub>$\beta$</sub> ), 39.9 (Leu-C <sub>$\beta$</sub> ), 41.4 (Gly-C <sub>$\alpha$</sub> ), 51.1 (Ala-C <sub>$\alpha$</sub> ), 51.3 (Asp-C <sub>$\alpha$</sub> ), 52.2 (COOCH<sub>3</sub>), 52.3 (Leu-C <sub>$\alpha$</sub> ), 55.7 (Tyr-C <sub>$\alpha$</sub> ), 60.4 (Thr-C <sub>$\beta$</sub> ), 66.5 (Thr-C <sub>$\alpha$</sub> ), 67.5 (Bn-CH<sub>3</sub>), 75.6 (Thr-CMe<sub>3</sub>), 78.8 (Asp-CMe<sub>3</sub>), 81.6 (Tyr-CMe<sub>3</sub>), 124.6 (Tyr-C<sub>Ar</sub>), 128.4 (Cbz-C<sub>Ar</sub>), 128.6 (Cbz-C<sub>Ar</sub>), 128.8 (Cbz-</sub></sub>



$C_{Ar}$ ), 129.6 (Tyr- $C_{Ar}$ ), 129.9 (Tyr- $C_{Ar,q}$ ), 136.1 (Cbz- $C_{Ar,q}$ ), 155.3 (Tyr- $C_{Ar,q}$ ), 156.6 (Cbz-CO), 170.1 (COOMe), 170.4 (Asp-COO $t$ Bu), 170.6 (Asp-CONH), 171.6 (Thr-C=O), 172.3 (Tyr-C=O), 172.6 (Leu-C=O), 172.8 (Ala-C=O).

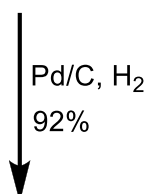
**IR:** (neat): 3277 (m, br), 3082 (w), 3075 (w), 1726 (m), 1628 (s), 1510 (m), 1448 (w), 1391 (w), 1366 (m), 1290 (w), 1227 (m), 1158 (s), 1095 (w), 1066 (w), 985 (w), 905 (m), 848 (w), 730 (s), 697 (m), 647 (m), 549 (w), 478 (w).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for  $C_{49}H_{74}N_6O_{13}Na$   $[M+Na]^+$ : 977.5206; found 977.5209.

#### 6.2.4.14 *O*-*tert*-Butyl-L-Threoninyl-*O*-*tert*-butyl-L-Tyrosinyl-L-Alaninyl-*O*-*tert*-butyl-Aspartatyl-L-Leucinyl-L-Glycinemethylester **91**

Cbz-Thr(*t*Bu)-Tyr(*t*Bu)-Ala-Asp(*t*Bu)-Leu-Gly-OMe

**116**



H-Thr(*t*Bu)-Tyr(*t*Bu)-Ala-Asp(*t*Bu)-Leu-Gly-OMe

**91**

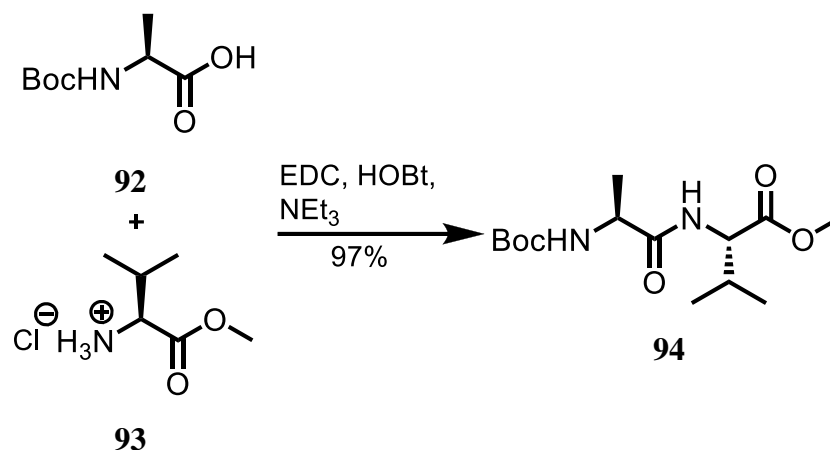
hexapeptide <b>116</b> [955.14]	100 mg	105 $\mu$ mol	1.0 eq
palladium on carbon [10% w/w]	11 mg	11 $\mu$ mol	0.1 eq

In a solution of hexapeptide **116** (100 mg, 105  $\mu$ mol) in MeOH (7 mL) was suspended palladium on carbon (10% w/w, 11 mg, 11  $\mu$ mol). The reaction was flushed with hydrogen and stirred under a hydrogen atmosphere for 2 h. The suspension was filtered over a short plug of celite and the filtrate was concentrated to dryness under reduced pressure to give amine **91** (93 mg, 97  $\mu$ mol, 92%) as a colorless solid.

---

<b>TLC:</b>	$R_f = 0.55$ (CHCl <sub>3</sub> /MeOH 10:1).
<b><sup>1</sup>H-NMR:</b>	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) $\delta$ = 0.88 (d, $J$ = 6.4 Hz, 3H, Leu-H <sub><math>\delta</math>a</sub> ), 0.94 (d, $J$ = 6.4 Hz, 3H, Leu-H <sub><math>\delta</math>b</sub> ), 1.02 (s, 9H, Thr- <i>t</i> Bu), 1.08 (d, $J$ = 6.2 Hz, 3H, Thr-H <sub><math>\gamma</math></sub> ), 1.33 (s, 9H, Asp- <i>t</i> Bu), 1.36 (d, $J$ = 7.4 Hz, 3H, Ala-H <sub><math>\beta</math></sub> ), 1.41 (s, 9H, Tyr- <i>t</i> Bu), 1.67 – 1.73 (m, 1H, Leu-H <sub><math>\gamma</math></sub> ), 1.82 – 1.86 (m, 2H, Leu-H <sub><math>\beta</math></sub> ), 2.78 – 2.94 (m, 2H, Asp-H <sub><math>\beta</math></sub> ), 2.93 – 3.06 (m, 1H, Tyr-H <sub><math>\beta</math>a</sub> ), 3.14 – 3.20 (m, 2H, Tyr-H <sub><math>\beta</math>b</sub> , Thr-H <sub><math>\alpha</math></sub> ), 3.73 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 3.92 ( <i>pseudo</i> -dd, $J$ = 5.1, 17.6 Hz, 1H, Gly-H <sub><math>\alpha</math>a</sub> ), 3.98 – 4.04 (m, 1H, Thr-H <sub><math>\beta</math></sub> ), 4.10 ( <i>pseudo</i> -dd, $J$ = 6.1, 17.8 Hz, 1H, Gly-H <sub><math>\alpha</math>b</sub> ), 4.19 – 4.28 (m, 1H, Ala-H <sub><math>\alpha</math></sub> ), 4.40 – 4.54 (m, 2H, Tyr-H <sub><math>\alpha</math></sub> , Leu-H <sub><math>\alpha</math></sub> ), 4.61 – 4.67 (m, 1H, Asp-H <sub><math>\alpha</math></sub> ), 6.87 (d, $J$ = 4.9 Hz, 1H, Thr-H <sub><math>\alpha</math></sub> ), 6.94 (d, $J$ = 8.5 Hz, 3H, Tyr-H <sub>Ar</sub> , Ala-NH), 7.10 (d, $J$ = 8.3 Hz, 3H, Tyr-H <sub>Ar</sub> , Gly-NH), 7.28 (d, $J$ = 6.8 Hz, 1H, Leu-NH), 7.47 (d, $J$ = 5.5 Hz, 1H, Tyr-NH), 7.62 (d, $J$ = 7.4 Hz, 1H, Asp-NH).
<b><sup>13</sup>C-NMR:</b>	(75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) $\delta$ = 17.2 (Ala-C <sub><math>\beta</math></sub> ), 19.4 (Thr-C <sub><math>\gamma</math></sub> ), 21.2 (Leu-C <sub><math>\delta</math>a</sub> ), 23.5 (Leu-C <sub><math>\delta</math>b</sub> ), 24.9 (Leu-C <sub><math>\gamma</math></sub> ), 28.1 (Asp-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 28.5 (Thr-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 29.0 (Tyr-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 35.9 (Tyr-C <sub><math>\beta</math></sub> ), 36.4 (Asp-C <sub><math>\beta</math></sub> ), 39.9 (Leu-C <sub><math>\beta</math></sub> ), 41.4 (Gly-C <sub><math>\alpha</math></sub> ), 51.1 (Ala-C <sub><math>\alpha</math></sub> ), 51.3 (Asp-C <sub><math>\alpha</math></sub> ), 52.2 (COOCH <sub>3</sub> ), 52.3 (Leu-C <sub><math>\alpha</math></sub> ), 55.6 (Tyr-C <sub><math>\alpha</math></sub> ), 59.7 (Thr-C <sub><math>\alpha</math></sub> ), 66.5 (Thr-C <sub><math>\beta</math></sub> ), 75.6 (Thr-CMe <sub>3</sub> ), 78.7 (Asp-CMe <sub>3</sub> ), 81.7 (Tyr-CMe <sub>3</sub> ), 124.5 (Tyr-C <sub>Ar</sub> ), 129.7 (Tyr-C <sub>Ar</sub> ), 130.6 (Tyr-C <sub>Ar,q</sub> ), 155.0 (Tyr-C <sub>Ar,q</sub> ), 170.3 (COOMe), 170.8 (Asp-COO <i>t</i> Bu), 170.8 (Asp-CONH), 172.8 (Leu-C=O), 172.9 (Ala-C=O), 173.0 (Tyr-C=O), 175.7 (Thr-C=O).
<b>IR:</b>	(neat): 3277 (m, br), 3083 (w), 3975 (m), 1734 (m), 1630 (s), 1528 (m), 1445 (w), 1367 (m), 1293 (w), 1233 (w), 1160 (m), 1108 (w), 1064 (w), 1015 (w), 964 (w), 902 (m), 849 (w), 731 (m).
<b>HRMS (ESI):</b>	$m/z$ calcd for C <sub>41</sub> H <sub>68</sub> N <sub>6</sub> O <sub>11</sub> H [M+H] <sup>+</sup> : 821.5019; found 821.5024.

---

6.2.4.15 *N*-*tert*-Butyl-L-Alaninyl-L-Valinemethylester **96**

Boc-L-Ala-OH <b>92</b> [189.21]	1.76 g	9.29 mmol	1.0 eq
H-L-Val-OMe·HCl <b>93</b> [167.63]	1.56 g	9.29 mmol	1.0 eq
HOBT [153.13]	2.13 g	13.9 mmol	1.5 eq
triethylamine [101.19; $\rho = 0.73$ ]	3.22 mL	23.2 mmol	2.5 eq
EDC [191.70]	2.22 g	11.6 mmol	1.25 eq

A solution of Boc-L-Ala-OH **92** (1.76 g, 9.29 mmol) and H-L-Val-OMe·HCl **93** (1.56 g, 9.29 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) was cooled down to 0 °C and triethylamine (3.22 mL, 23.2 mmol) and HOBT (2.13 g, 13.9 mmol) were added. The solution was stirred for 15 min at 0 °C and EDC (2.22 g, 11.6 mmol) was added. The solution was allowed to warm up to RT and stirred overnight. The reaction mixture was poured into a mixture of sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> (40 mL) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) and the organic layer was separated. The combined organic layers were washed with 1 M NaHCO<sub>3</sub> (40 mL), H<sub>2</sub>O (40 mL) and brine (40 mL) and dried over MgSO<sub>4</sub>. The solvent was removed under reduced pressure and the remaining solid was purified by flash column chromatography on silica gel (EtOAc/pentane 1:2) to give dipeptide **96** (2.66 g, 9.03 mmol, 97%) as a thick, colorless oil.

**TLC:**  $R_f = 0.44$  (EtOAc/hexane 1:1).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 0.89$  (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H, Val-H<sub>γa</sub>), 0.92 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H, Val-H<sub>γb</sub>), 1.35 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H, Ala-H<sub>β</sub>), 1.44 (s, 9H, Boc-*t*Bu), 2.11 – 2.22 (m, 1H, Val-H<sub>β</sub>), 3.72 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.18 (t,

$J = 6.8$  Hz, 1H, Val- $H_\alpha$ ), 4.52 (dd,  $J = 4.9, 8.9$  Hz, 1H, Ala- $H_\alpha$ ), 5.01 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H, Ala-NH), 6.67 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H, Val-CH).

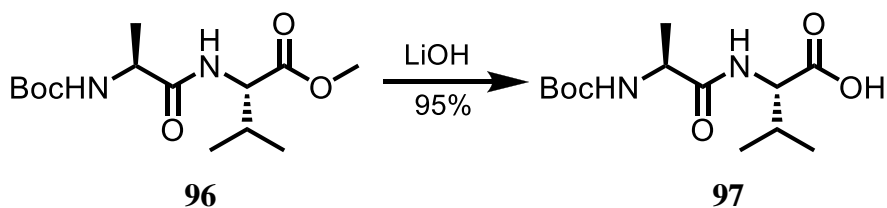
**$^{13}\text{C}$ -NMR:** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 17.8$  (Ala- $\text{C}_\beta$ ), 19.1 (2C, Val- $\text{C}_\gamma$ ), 28.4 (3C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 31.4 (Val- $\text{C}_\beta$ ), 50.2 ( $\text{COOCH}_3$ ), 52.2 (Ala- $\text{C}_\alpha$ ), 57.2 (Val- $\text{C}_\alpha$ ), 80.3 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 155.6 (Boc- $\text{C}=\text{O}$ ), 172.3 (Val- $\text{C}=\text{O}$ ), 172.6 (Ala- $\text{C}=\text{O}$ ).

**IR:** (neat): 3311 (m, br), 2971 (m), 1741 (m), 1660 (s), 1515 (s), 1448 (m), 1366 (m), 1314 (w), 1248 (m), 1207 (w), 1162 (s), 1115 (w), 1067 (w), 1050 (w), 1020 (m), 964 (w), 859 (w), 760 (w), 596 (w).

**spec. rot.:**  $c = 10$ , MeOH,  $\vartheta = 23$  °C  
 $[\alpha]_D = -25.6$ ,  $[\alpha]_{578} = -27.8$ ,  $[\alpha]_{546} = -30.5$ ,  $[\alpha]_{436} = -33.8$ ,  $[\alpha]_{365} = -38.4$ .

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 325.1739; found 325.1742.

#### 6.2.4.16 *N*-tert-Butyl-L-Alaninyl-L-Valine **97**



dipeptide <b>96</b> [302.37]	1.66 g	5.50 mmol	1.0 eq
LiOH·H <sub>2</sub> O [41.96]	576 mg	13.7 mmol	2.5 eq

A solution of dipeptide **96** (1.56 g, 5.50 mmol) in THF (100 mL) was cooled down to 0 °C and a solution of LiOH·H<sub>2</sub>O (576 mg, 13.7 mmol) in H<sub>2</sub>O (25 mL) was added. The mixture was stirred for 2.5 h at RT and acidified with 1 M aq. NaHSO<sub>4</sub> (pH 4-5). The organic solvent was removed under reduced pressure and  $\text{CHCl}_3/i\text{PrOH}$  (5:1, 60 mL) and NaHSO<sub>4</sub> (25 mL) were added. The organic layer was separated and the aqueous layer was washed with  $\text{CHCl}_3/i\text{PrOH}$  (5:1, 4x 60 mL). The combined organic layers were washed with brine (30 mL)

and dried over  $\text{MgSO}_4$ . The solvent was removed under reduced pressure and purified by flash column chromatography on silica gel (pentane/EtOAc/HCOOH 7.5:2.5:0.1  $\rightarrow$  5:5:0.1) to give acid **97** (1.51 g, 5.22 mmol, 95%) as a colorless solid.

**TLC:**  $R_f = 0.29$  (hexane/EtOAc/HCOOH 5:5:0.1).

**m.p.:** 160 – 161 °C ( $\text{CHCl}_3$ /*i*PrOH).

**$^1\text{H}$ -NMR:** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 0.94$  (dd,  $J = 7.0, 7.0$  Hz, 6H, 2x Val- $\text{H}_\gamma$ ), 1.34 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H, Ala- $\text{H}_\beta$ ), 1.42 (s, 9H, Boc-*t*Bu), 2.18 – 2.29 (m, 1H, Val- $\text{H}_\beta$ ), 4.27 (t,  $J = 6.4$  Hz, 1H, Val- $\text{H}_\alpha$ ), 4.55 (dd,  $J = 4.7, 8.8$  Hz, 1H, Ala- $\text{H}_\alpha$ ), 5.36 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1H, Ala-NH), 7.01 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H, Val-NH).

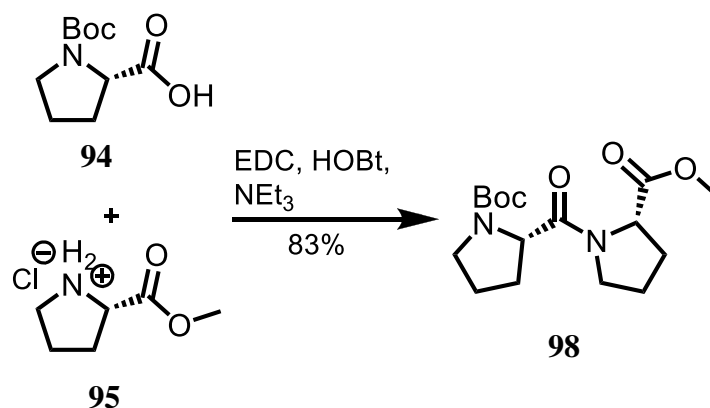
**$^{13}\text{C}$ -NMR:** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 17.6$  (Ala- $\text{C}_\beta$ ), 19.1 (2C, Val- $\text{C}_\gamma$ ), 28.4 (3C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 31.2 (Val- $\text{C}_\beta$ ), 50.2 (Ala- $\text{C}_\alpha$ ), 57.2 (Val- $\text{C}_\alpha$ ), 80.6 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 156.0 (Boc-C=O), 173.3 (Ala-C=O), 174.9 (Val-C=O).

**IR:** (neat): 3425 (w), 3362 (w), 2973 (m), 2934 (w), 2880 (w), 2618 (w), 2465 (w), 1700 (s), 1630 (s), 1549 (s), 1501 (s), 1462 (w), 1388 (w), 1366 (m), 1307 (w), 1243 (s), 1165 (s), 1071 (m), 1023 (m), 944 (m), 865 (m), 780 (m), 748 (w), 697 (m), 638 (w), 603 (w), 493 (s), 414 (w).

**spec. rot.:**  $c = 10$ , MeOH,  $\vartheta = 23$  °C  
 $[\alpha]_{\text{D}} = -28.3$ ,  $[\alpha]_{578} = -31.1$ ,  $[\alpha]_{546} = -34.4$ ,  $[\alpha]_{436} = -39.1$ ,  $[\alpha]_{365} = -45.7$ .

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 311.1577; found 311.1571.

#### 6.2.4.17 *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-L-Prolinyl-L-Prolinemethylester **97**



Boc-L-Pro-OH <b>94</b> [215.25]	2.60 g	9.29 mmol	1.0 eq
H-L-Pro-OMe·HCl <b>95</b> [165.62]	1.54 g	9.29 mmol	1.0 eq
HOBT [153.13]	2.13 g	13.9 mmol	1.5 eq
triethylamine [101.19; $\rho = 0.73$ ]	3.22 mL	23.2 mmol	2.5 eq
EDC [191.70]	2.22 g	11.6 mmol	1.25 eq

A solution of Boc-L-Pro-OH **94** (2.60 g, 9.29 mmol) and H-L-Pro-OMe·HCl **95** (1.54 g, 9.29 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) was cooled down to 0 °C. Triethylamine (3.22 mL, 23.2 mmol) and HOBT (2.13 g, 13.9 mmol) were added. The solution was stirred for 15 min at 0 °C and EDC (2.22 g, 11.6 mmol) was added. The solution was heated to reflux and stirred for 24 h. The reaction mixture was cooled down to RT and poured into a mixture of sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> (40 mL) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) and the organic layer was separated. The organic layer was washed with 1 M NaHCO<sub>3</sub> (40 mL), H<sub>2</sub>O (40 mL) and brine (40 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, the solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 100:2) to give dipeptide **98** (2.52 g, 7.71 mmol, 83%) as a colorless foam.

mixture of rotameres

**TLC:**  $R_f = 0.43$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 10:1).

---

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 1.38 – 1.44 (*pseudo*-d, 9H, Boc-*t*Bu), 1.79 – 2.22 (m, 8H, 4x Pro-CH<sub>2</sub>), 3.33 – 3.80 (m, 4H, 2x Pro-CH<sub>2</sub>), 3.69 – 3.71 (*pseudo*-d, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.36 – 4.60 (m, 2H, 2x Pro-CH).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 23.7 (Pro-CH<sub>2</sub>), 24.2 (Pro-CH<sub>2</sub>), 25.1 (Pro-CH<sub>2</sub>), 25.2 (Pro-CH<sub>2</sub>), 28.5 (3C, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.7 (3C, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.9 (Pro-CH<sub>2</sub>), 29.0 (Pro-CH<sub>2</sub>), 29.2 (Pro-CH<sub>2</sub>), 30.2 (Pro-CH<sub>2</sub>), 46.6 (2C, 2x Pro-CH<sub>2</sub>), 46.8 (Pro-CH<sub>2</sub>), 47.0 (Pro-CH<sub>2</sub>), 52.2 (Pro-CH<sub>2</sub>), 52.3 (Pro-CH<sub>2</sub>), 57.8 (Pro-CH<sub>2</sub>), 57.9 (Pro-CH<sub>2</sub>), 58.8 (2C, Pro-CH<sub>2</sub>), 79.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 79.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 153.9 (Boc-C=O), 154.7 (Boc-C=O), 171.3 (CON), 171.7 (CON), 172.8 (COO), 173.1 (COO).

A nonambiguous assignment could not be made due to a mixture of rotameres.

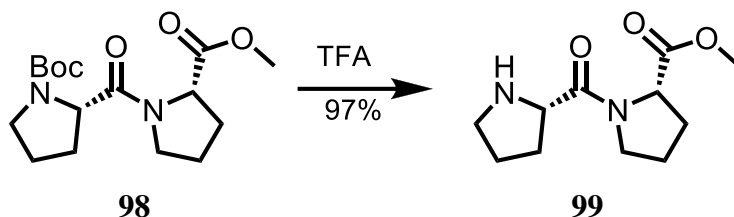
**IR:** (neat): 3496 (m, br), 2974 (m), 2879 (w), 1787 (m), 1744 (s), 1694 (s), 1657 (s), 1433 (m), 1395 (s), 1364 (s), 1324 (m), 1250 (w), 1163 (s), 1124 (m), 1092 (m), 1021 (w), 920 (w), 899 (w), 855 (w), 773 (w), 550 (w).

**spec. rot.:**  $c = 10$ , MeOH,  $\vartheta = 23$  °C  
 $[\alpha]_D = -81$ ,  $[\alpha]_{578} = -87$ ,  $[\alpha]_{546} = -97$ ,  $[\alpha]_{436} = -111$ ,  $[\alpha]_{365} = -125$ .

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 349.1734; found 349.1737.

---

#### 6.2.4.18 L-Prolinyl-L-Prolinemethylester **99**



dipeptide <b>98</b> [326.39]	2.52 g	7.71 mmol	1.0 eq
trifluoroacetic acid [97.02]	50 Vol%		

To a solution of dipeptide **98** (2.52 g, 7.71 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) trifluoroacetic acid (30 mL) was added at 0 °C. The ice bath was removed and the mixture was stirred for 1 h at RT. Toluene (30 mL) was added and the solvents were coevaporated five times. The remaining oil was taken up in EtOAc (15 mL) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5g) was added. The suspension was stirred at RT for 3 h and filtered through a short plug of celite. Removal of the solvent gave amine **99** (1.70 g, 7.51 mmol, 97%) as a highly viscous, slightly yellow oil.

mixture of rotameres

**TLC:**  $R_f = 0.41$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub> 10:1:0.1).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 1.72 - 2.46$  (m, 8H, 4x Pro-CH<sub>2</sub>), 3.33 – 3.72 (m, 7H, Pro-CH<sub>2</sub>, COOCH<sub>3</sub>), 4.26 – 4.44 (m, 2H, 2x Pro-CH), 4.53 (s br, 1H, NH).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 22.9$  (CH<sub>2</sub>), 23.5 (CH<sub>2</sub>), 24.6 (CH<sub>2</sub>), 27.2 (CH<sub>2</sub>), 27.8 (CH<sub>2</sub>), 28.5 (CH<sub>2</sub>), 44.6 (CH<sub>2</sub>), 45.7 (CH<sub>2</sub>), 46.5 (CH<sub>2</sub>), 52.0 (COOCH<sub>3</sub>), 57.2 (CH), 58.7 (CH), 59.7 (CH), 157.9 (COO), 158.3 (COO), 166.0 (CON), 166.8 (CON).

A nonambiguous assignment could not be made due to a mixture of rotameres

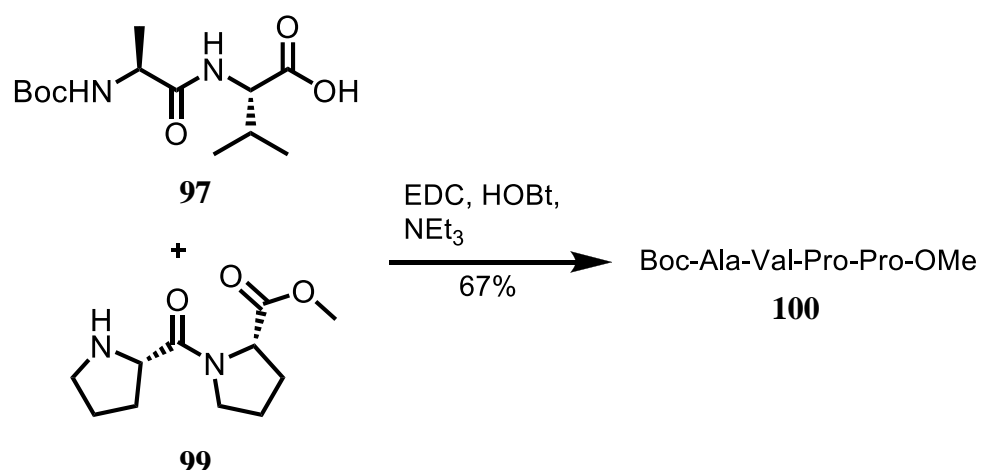


**IR:** (neat): 2964 (w), 1742 (w), 1661 (s), 1432 (m), 1370 (w), 1287 (w), 1169 (s), 1121 (s), 831 (m), 799 (m), 716 (m), 637 (w), 595 (w), 517 (w).

**spec. rot.:**  $c = 10$ , MeOH,  $\vartheta = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$   
 $[\alpha]_{\text{D}} = -76$ ,  $[\alpha]_{578} = -85$ ,  $[\alpha]_{546} = -93$ ,  $[\alpha]_{436} = -107$ ,  $[\alpha]_{365} = -122$ .

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 227.1390; found 227.1390.

#### 6.2.4.19 *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-L-Alaninyl-L-Valinyl-L-Prolinyl-L-Prolinemethyl-ester **100**



acid <b>97</b> [288.34]	2.31 g	8.00 mmol	1.05 eq
amine <b>99</b> [226.27]	1.74 g	7.70 mmol	1.0 eq
HOBT [153.13]	2.34 g	15.4 mmol	2.0 eq
triethylamine [101.19; $\rho = 0.73$ ]	3.20 mL	23.1 mmol	3.0 eq
EDC [191.70]	2.95 g	15.4 mmol	2.0 eq

A solution of amine **99** (1.74 g, 7.70 mmol) and acid **97** (2.31 g, 8.00 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (60 mL) was cooled down to  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  and triethylamine (3.20 mL, 23.1 mmol) and HOBT (2.34 g, 15.4 mmol) were added. The solution was stirred for 10 min at  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  and EDC (2.95 g, 15.4 mmol) was added. The reaction mixture was stirred overnight and poured into a mixture of sat. aq.  $\text{NaHCO}_3$  (40 mL) and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL). The organic layer was separated

---

and washed with 1 M NaHCO<sub>3</sub> (40 mL), H<sub>2</sub>O (40 mL) and brine (40 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 200:3) to give tetrapeptide **100** (2.56 g, 5.17 mmol, 67%) as a colorless foam.

mixture of rotameres

**TLC:**  $R_f = 0.51$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 10:1).

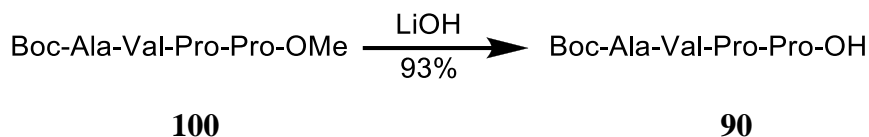
**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 0.81 – 1.01 (m, 6H, 2x Val-H <sub>$\gamma$</sub> ), 1.31 – 1.37 (m, 3H, Ala-H <sub>$\beta$</sub> ), 1.43 (s, 9H, Boc-*t*Bu), 1.87 – 2.37 (m, 9H, 4x Pro-CH<sub>2</sub>, Val-H <sub>$\beta$</sub> ), 3.51 – 4.20 (m, 9H, 2x Pro-CH<sub>2</sub>, 2x Pro-CH, COOCH<sub>3</sub>), 4.97 – 5.12 (m, 1H, Ala-NH), 6.59 – 6.88 (m, 1H, Val-NH).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 17.5, 17.7, 19.6, 19.9, 23.5, 24.6, 25.0, 25.0, 25.1, 25.2, 27.8, 28.4 (3C, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.9, 31.5, 31.6, 45.3, 46.7, 47.7, 52.3, 55.5, 55.6, 58.1, 58.7, 58.8, 60.7, 79.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 155.3 (Boc-C=O), 155.2 (Boc-C=O), 170.0, 170.2, 170.3, 170.5, 172.4, 172.5, 172.8, 172.9.

A nonambiguous assignment could not be made due to a mixture of rotameres

**IR:** (neat): 3295 (m, br), 2972 (m), 2878 (w), 1743 (w), 1709 (m), 1627 (s), 1514 (m), 1440 (s), 1364 (m), 1323 (w), 1246 (m), 1165 (s), 1096 (w), 1050 (w), 1021 (w), 919 (w), 865 (w), 781 (w), 732 (w), 699 (m), 591 (w), 545 (w).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for C<sub>24</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>Na[M+Na]<sup>+</sup>: 519.2789; found 519.2774.

**6.2.4.20 *N*-tert-Butyloxycarbonyl-L-Alaninyl-L-Valinyl-L-Prolinyl-L-Proline 90**

tetrapeptide <b>100</b> [496.60]	434 mg	0.87 mmol	1.0 eq
LiOH·H <sub>2</sub> O [41.96]	91 mg	2.17 mmol	2.5 eq

A solution of tetrapeptide **100** (434 mg, 0.87 mmol) in THF (20 mL) was cooled down to 0 °C and a solution of LiOH·H<sub>2</sub>O (91 mg, 2.17 mmol) in H<sub>2</sub>O (5 mL) was added. The mixture was stirred for 3.5 h at RT and acidified with 1 M aq. NaHSO<sub>4</sub> (pH 4-5). The organic solvent was removed under reduced pressure and CHCl<sub>3</sub>/*i*PrOH (5:1, 10 mL) and NaHSO<sub>4</sub> (5 mL) were added. The organic layer was separated and the aqueous layer was washed with CHCl<sub>3</sub>/*i*PrOH (5:1, 4x 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (5 mL) and dried over MgSO<sub>4</sub>. The solvent was removed under reduced pressure to give acid **90** (390 mg, 0.81 mmol, 93%) as a colorless foam.

mixture of rotameres

**TLC:**  $R_f = 0.10$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 0.89 – 1.00 (m, 6H, 2x Val-H<sub>γ</sub>), 1.24 – 1.36 (m, 3H, Ala-H<sub>β</sub>), 1.42 (s, 9H, Boc-*t*Bu), 1.98 – 2.29 (m, 9H, 4x Pro-CH<sub>2</sub>, Val-H<sub>β</sub>), 3.49 – 3.90 (m, 4H, 2x Pro-CH<sub>2</sub>), 4.09 – 4.22 (m, 1H, Pro-CH), 4.55 – 4.64 (m, 3H, Ala-H<sub>α</sub>, Val-H<sub>α</sub>, Pro-CH), 5.11 – 5.13 (m, 1H, Ala-NH), 7.11 – 7.08 (m, 1H, Val-NH).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 17.8, 18.3, 18.9, 19.4, 19.7, 23.4, 23.9, 24.0, 25.0, 25.3, 27.8, 28.2, 28.4 (3C, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.3, 29.6, 29.6, 31.3, 45.3, 47.2, 47.8, 55.8, 58.1, 59.3, 60.7, 64.5, 67.5, 67.7, 80.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 155.4 (Boc-C=O), 155.5 (Boc-C=O), 170.6, 170.7, 171.8, 172.9, 173.8.

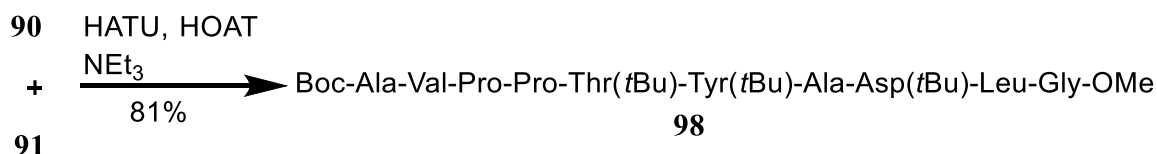
A nonambiguous assignment could not be made due to a mixture of rotameres

---

**IR:** (neat): 3246 (m, br), 2964 (m), 2834 (w), 1814 (m), 1776 (w), 1762 (m), 1631 (s), 1557 (m), 1497 (w), 1412 (s), 1326 (m), 1301 (w), 1278 (m), 1212 (w), 1117 (s), 1084 (w), 1047 (w), 1011 (w), 972 (w), 816 (w), 794 (w), 742 (w), 648 (m), 567 (w), 512 (w).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for  $C_{23}H_{39}N_4O_7$   $[M+H]^+$ : 483.2819; found 483.2818.

**6.2.4.21 *N*-tert-Butyloxycarbonyl-L-Alaninyl-L-Valinyl-L-Prolinyl-L-Prolinyl-*O*-tert-butyl-L-Threoninyl-*O*-tert-butyl-L-Tyrosinyl-L-Alaninyl-*O*-tert-butyl-Aspartatyl-L-Leucinyl-L-Glycinemethylester **98****



acid <b>90</b> [482.57]	579 mg	1.2 mmol	1.2 eq
amine <b>91</b> [821.01]	821 mg	1.0 mmol	1.0 eq
HOAt [136.11]	272 mg	2.0 mmol	2.0 eq
triethylamine [101.19; $\rho = 0.73$ ]	208 $\mu$ L	1.5 mmol	1.5 eq
HATU [380.20]	570 mg	1.5 mmol	1.5 eq

Acid **90** (579 mg, 1.2 mmol) and amine **91** (821 mg, 1.0 mmol) were dissolved in  $CH_2Cl_2$  (15 mL) and DMF (5 mL).  $NEt_3$  (208  $\mu$ L, 1.5 mmol) and HOAt (272 mg, 2.0 mmol) were added at 0 °C and the reaction was stirred for 10 min. HATU (570 mg, 1.5 mmol) was added at 0 °C and the mixture was stirred for 8 h at RT. The solution was diluted with  $CH_2Cl_2$  (20 mL) and extracted with sat. aq.  $NaHCO_3$  (20 mL), 1 M  $NaHSO_4$  (20 mL) and brine (20 mL). The combined organic layers were dried over  $MgSO_4$  and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash column chromatography ( $CHCl_3/MeOH$  200:3) to give decamer **98** (1.04 g, 0.81 mmol, 81%) as a white solid.

---

mixture of rotameres

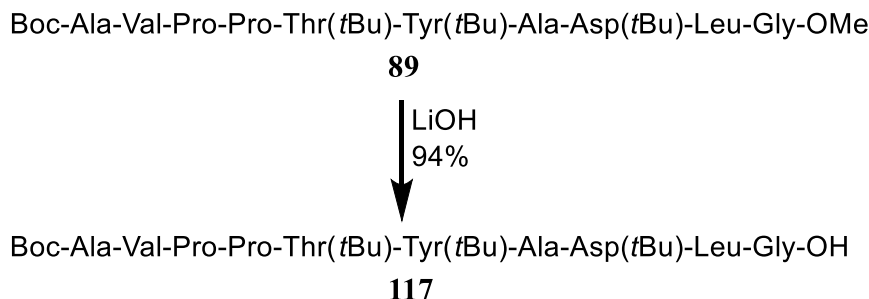
**TLC:**  $R_f = 0.49$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta = 0.88 - 1.02$  (m, 21H, 2x Val-H <sub>$\gamma$</sub> , 2x Leu-H <sub>$\delta$</sub> , Thr-*t*Bu), 1.12 – 1.19 (m, 3H, Thr-H <sub>$\gamma$</sub> ), 1.27 – 1.35 (m, 12H, Asp-*t*Bu, Ala-H <sub>$\beta$</sub> ), 1.36 – 1.41 (m, 10H, Tyr-*t*Bu, Leu-H <sub>$\gamma$</sub> ), 1.42 – 1.48 (m, 12H, Boc-*t*Bu, Ala-H <sub>$\beta$</sub> ), 1.67 – 1.88 (m, 3H, Val-H <sub>$\beta$</sub> , Leu-H <sub>$\beta$</sub> ), 1.90 – 2.35 (m, 8H, 4x Pro-CH<sub>2</sub>), 2.71 – 2.84 (m, 1H, Asp-CH<sub>2a</sub>), 2.91 – 3.24 (m, 4H, Asp-CH<sub>2b</sub>, Tyr-H <sub>$\beta$</sub> , Thr-H <sub>$\alpha$</sub> ), 3.55 – 3.78 (m, 5H, OCH<sub>3</sub>, Pro-CH<sub>2</sub>), 3.87 – 4.00 (m, 2H, Gly-CH<sub>2a</sub>, Thr-H <sub>$\beta$</sub> ), 4.03 – 4.32 (m, 5H, Pro-CH<sub>2</sub>, Pro-CH, Gly-CH<sub>2b</sub>, Ala-CH), 4.33 – 4.77 (m, 6H, Ala-CH, Val-CH, Pro-CH, Tyr-CH, Leu-H <sub>$\alpha$</sub> , Asp-CH), 4.88 – 5.00 (m, 1H, Thr-H <sub>$\gamma$</sub> ), 6.56 – 6.77 (m, 1H, Ala-NH), 6.84 – 6.90 (m, 2H, Tyr-H<sub>Ar</sub>), 7.13 – 7.49 (m, 9H, Tyr-H<sub>Ar</sub>, Ala-NH, Val-NH, Gly-NH, Leu-NH, Tyr-NH, Asp-NH, Thr-NH).

**IR:** (neat): 3276 (m, br), 2976 (w), 1732 (w), 1627 (s), 1527 (m), 1445 (w), 1390 (w), 1366 (m), 1304 (w), 1292 (w), 1157 (s), 1112 (w), 1089 (w), 957 (w), 913 (m), 834 (w), 767 (s), 684 (m), 56 (w), 478 (w).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for C<sub>64</sub>H<sub>104</sub>N<sub>10</sub>O<sub>17</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 1307.7473; found 1307.7468.

**6.2.4.22 *N*-tert-Butyloxycarbonyl-L-Alaninyl-L-Valinyl-L-Prolinyl-L-Prolinyl-*O*-tert-butyl-L-Threoninyl-*O*-tert-butyl-L-Tyrosinyl-L-Alaninyl-*O*-tert-butyl-Aspartatyl-L-Leuciny-L-Glycine 117**



decamer <b>89</b> [496.60]	1.00 g	0.78 mmol	1.0 eq
LiOH·H <sub>2</sub> O [41.96]	82 mg	1.94 mmol	2.5 eq

A solution of tetrapeptide **89** (1.0 g, 0.78 mmol) in THF (30 mL) was cooled down to 0 °C and a solution of LiOH·H<sub>2</sub>O (91 mg, 2.17 mmol) in H<sub>2</sub>O (10 mL) was added. The mixture was stirred for 4 h at RT and acidified with 1 M aq. NaHSO<sub>4</sub> (pH 4-5). The organic solvent was removed under reduced pressure and CHCl<sub>3</sub>/*i*PrOH (5:1, 20 mL) and NaHSO<sub>4</sub> (10 mL) were added. The organic layer was separated and the aqueous layer was washed with CHCl<sub>3</sub>/*i*PrOH (5:1, 4x 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (5 mL) and dried over MgSO<sub>4</sub>. The solvent was removed under reduced pressure to give acid **117** (390 mg, 0.81 mmol, 94%) as a colorless solid.

mixture of rotameres

**TLC:**  $R_f = 0.35$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/HCOOH 10:1:0.1).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta = 0.76 - 0.98$  (m, 12H, 2x Val-H <sub>$\gamma$</sub> , 2x Leu-H <sub>$\delta$</sub> ), 0.99 – 1.09 (m, 18H, Thr-*t*Bu, Asp-*t*Bu), 1.10 – 1.22 (m, 6H, Thr-H <sub>$\gamma$</sub> , Ala-H <sub>$\beta$</sub> ), 1.24 (s, 9H, Tyr-*t*Bu), 1.37 (s, 9H, Boc-*t*Bu), 1.40 – 1.50 (m, 4H, Ala-H <sub>$\beta$</sub> , Leu-H <sub>$\gamma$</sub> ), 1.58 – 2.04 (m, 11H, Val-H <sub>$\beta$</sub> , Leu-H <sub>$\beta$</sub> , 4x Pro-CH<sub>2</sub>), 2.55 – 2.83 (m, 3H, Tyr-H <sub>$\beta$</sub> , Thr-H <sub>$\alpha$</sub> ), 2.92 – 3.03 (m, 1H, Asp-CH<sub>2a</sub>), 3.06 – 3.16 (m, 1H, Asp-CH<sub>2b</sub>), 3.28 – 3.64 (m, 2H, Pro-CH<sub>2</sub>), 3.68 – 3.92 (m, 2H, Gly-CH<sub>2a</sub>, Thr-H <sub>$\beta$</sub> ), 3.96 – 4.37 (m, 5H, Pro-CH<sub>2</sub>,

Pro-CH, Gly-CH<sub>2b</sub>, Ala-CH), 4.41 – 4.82 (m, 7H, Ala-CH, Val-CH, Pro-CH, Tyr-CH, Leu-H<sub>α</sub>, Asp-CH, Thr-H<sub>γ</sub>), 5.35 – 3.40 (m, 1H, Ala-NH), 6.78 – 6.88 (m, 2H, Tyr-H<sub>Ar</sub>), 6.86 – 7.13 (m, 2H, Tyr-H<sub>Ar</sub>), 7.44 – 8.74 (m, 8H, Ala-NH, Val-NH, Gly-NH, Leu-NH, Tyr-NH, Asp-NH, Thr-NH).

**IR:** (neat): 3257 (m, br), 2994 (w), 1802 (w), 1676 (s), 1542 (m), 1454 (m), 1359 (w), 1364 (m), 1324 (w), 1257 (w), 1199 (s), 1154 (w), 1087 (w), 1006 (m), 978 (w), 924 (m), 867 (w), 748 (s), 678 (m), 524 (w), 496 (w).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calcd for C<sub>63</sub>H<sub>102</sub>N<sub>10</sub>O<sub>17</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 1293.7322; found 1293.7327.

## 6.3 Kristallstrukturendaten

### 6.3.1 Röntgenstrukturanalyse des Sulfonats **59**

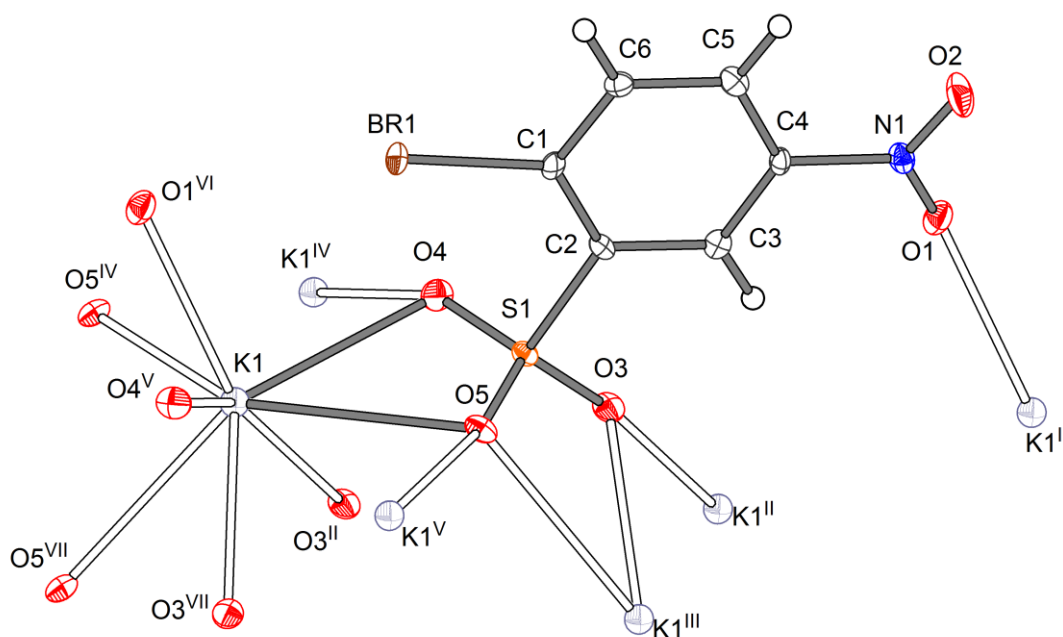


Abb. 3.1: Kristallstrukturbild von Verbindung **59**.

Table 1. Crystal data and structure refinement for **59**.

Crystal data		
Habitus, colour	needle, colourless	
Crystal size	0.34 x 0.06 x 0.04 mm <sup>3</sup>	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P 2 <sub>1</sub> /c	Z = 4
Unit cell dimensions	a = 13.827(2) Å	α = 90°.
	b = 9.5786(14) Å	β = 99.576(5)°.
	c = 7.0811(10) Å	γ = 90°.
Volume	924.8(2) Å <sup>3</sup>	
Cell determination	109 peaks with 2Theta 7.5 to 54°.	
Empirical formula	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> Br K N O <sub>5</sub> S	
Formula weight	320.16	
Density (calculated)	2.300 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	5.119 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	624	

Data collection:



---

Diffractometer type	Bruker D8 QUEST area detector
Wavelength	0.71073 Å
Temperature	100(2) K
Theta range for data collection	2.599 to 27.076°.
Index ranges	-17<=h<=17, -12<=k<=12, -9<=l<=8
Data collection software	BRUKER APEX II
Cell refinement software	BRUKER SAINT
Data reduction software	Bruker APEX II

## Solution and refinement:

Reflections collected	6144
Independent reflections	2028 [R(int) = 0.0444]
Completeness to theta = 25.242°	99.6 %
Observed reflections	1726[II > 2(I)]
Reflections used for refinement	2028
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents
Max. and min. transmission	0.82 and 0.61
Largest diff. peak and hole	0.478 and -0.497 e.Å <sup>-3</sup>
Solution	Direct Methods
Refinement	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>
Treatment of hydrogen atoms	Calculated positions, constr. ref
Programs used	SHELXS-97 (Sheldrick, 2008) SHELXL-2013 (Sheldrick, 2013) DIAMOND (Crystal Impact)
Data / restraints / parameters	2028 / 0 / 136
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.036
R index (all data)	wR2 = 0.0580
R index conventional [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0257

---

Table 2: Atomic coordinates and equivalent isotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2$ ) for **59**.  
 $U(\text{eq})$  is defined as one third of the trace of the orthogonalized  $U^{\text{ij}}$  tensor.

	x	y	z	$U(\text{eq})$	Occupancy
C1	0.67684(19)	0.5439(2)	0.6305(3)	0.0100(5)	1
C2	0.76204(18)	0.6176(2)	0.6123(3)	0.0084(5)	1
C3	0.75903(19)	0.7626(2)	0.6081(3)	0.0098(5)	1
C4	0.67134(19)	0.8286(2)	0.6223(4)	0.0094(5)	1
C5	0.58680(19)	0.7586(3)	0.6430(4)	0.0117(5)	1
C6	0.59031(19)	0.6143(3)	0.6469(4)	0.0109(5)	1
N1	0.66933(16)	0.9819(2)	0.6100(3)	0.0118(4)	1
O1	0.74015(14)	1.04092(18)	0.5605(3)	0.0154(4)	1
O2	0.59677(15)	1.04297(18)	0.6462(3)	0.0215(5)	1
O3	0.93800(13)	0.65342(17)	0.5518(3)	0.0135(4)	1
O4	0.85376(14)	0.43893(18)	0.4319(3)	0.0149(4)	1
O5	0.91209(13)	0.46885(18)	0.7718(3)	0.0132(4)	1
S1	0.87650(5)	0.53701(6)	0.58905(9)	0.00917(14)	1
K1	0.92434(4)	0.17672(5)	0.61127(8)	0.01201(13)	1
Br1	0.67160(2)	0.34691(2)	0.63151(4)	0.01288(9)	1

Table 3: Bond lengths [ $\text{\AA}$ ] and angles [ $^\circ$ ] for **59**. Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:  
#1 x,y+1,z #2 -x+2,-y+1,-z+1 #3 -x+2,y+1/2,-z+3/2 #4 x,-y+1/2,z-1/2 #5 x,-y+1/2,z+1/2  
#6 x,y-1,z #7 -x+2,y-1/2,-z+3/2

C1-C2	1.397(3)	O4-S1	1.4505(19)
C1-C6	1.395(3)	O4-K1#4	2.8408(18)
C1-Br1	1.889(2)	O4-K1	2.9090(19)
C2-C3	1.390(3)	O5-S1	1.4600(18)
C2-S1	1.793(2)	O5-K1	3.0357(19)
C3-H3	0.9500	O5-K1#3	3.0236(19)
C3-C4	1.386(3)	O5-K1#5	2.7595(18)
C4-C5	1.376(3)	S1-K1	3.5125(9)
C4-N1	1.471(3)	S1-K1#3	3.4544(9)
C5-H5	0.9500	K1-O1#6	2.8289(19)
C5-C6	1.383(3)	K1-O3#7	2.803(2)
C6-H6	0.9500	K1-O3#2	2.8869(18)
N1-O1	1.231(3)	K1-O4#5	2.8408(18)
N1-O2	1.225(3)	K1-O5#4	2.7595(18)
O1-K1#1	2.8289(19)	K1-O5#7	3.0237(19)
O3-S1	1.4529(18)	K1-S1#7	3.4544(9)
O3-K1#2	2.8870(18)	K1-K1#4	3.8087(6)
O3-K1#3	2.803(2)	K1-K1#5	3.8088(6)
C2-C1-Br1	122.56(18)	C4-C5-H5	121.3
C6-C1-C2	120.8(2)	C4-C5-C6	117.5(2)
C6-C1-Br1	116.67(18)	C6-C5-H5	121.3
C1-C2-S1	124.20(18)	C1-C6-H6	119.7
C3-C2-C1	118.9(2)	C5-C6-C1	120.6(2)
C3-C2-S1	116.87(19)	C5-C6-H6	119.7
C2-C3-H3	120.7	O1-N1-C4	117.8(2)
C4-C3-C2	118.6(2)	O2-N1-C4	118.2(2)
C4-C3-H3	120.7	O2-N1-O1	124.0(2)
C3-C4-N1	117.4(2)	N1-O1-K1#1	156.48(16)
C5-C4-C3	123.6(2)	S1-O3-K1#3	103.98(9)
C5-C4-N1	119.0(2)	S1-O3-K1#2	161.81(11)

---

K1#3-O3-K1#2	84.03(5)	O3#2-K1-S1	63.90(4)
S1-O4-K1	102.12(10)	O3#2-K1-K1#5	105.42(4)
S1-O4-K1#4	143.74(11)	O3#7-K1-K1#4	135.70(4)
K1#4-O4-K1	82.96(5)	O3#7-K1-K1#5	48.93(4)
S1-O5-K1	96.42(9)	O3#2-K1-K1#4	47.04(4)
S1-O5-K1#3	94.28(8)	O4#5-K1-O3#2	151.20(6)
S1-O5-K1#5	163.93(11)	O4#5-K1-O4	123.42(6)
K1#3-O5-K1	128.59(6)	O4-K1-O5#7	150.40(5)
K1#5-O5-K1	82.03(5)	O4#5-K1-O5#7	82.26(5)
K1#5-O5-K1#3	99.18(6)	O4#5-K1-O5	90.70(5)
C2-S1-K1#3	113.74(8)	O4-K1-O5	48.10(5)
C2-S1-K1	125.54(8)	O4#5-K1-S1	109.37(4)
O3-S1-C2	103.81(11)	O4-K1-S1	23.81(4)
O3-S1-O5	112.53(11)	O4-K1-S1#7	141.08(4)
O3-S1-K1#3	51.93(8)	O4#5-K1-S1#7	72.71(4)
O3-S1-K1	130.59(8)	O4#5-K1-K1#4	160.00(4)
O4-S1-C2	105.50(11)	O4-K1-K1#5	92.05(4)
O4-S1-O3	114.60(11)	O4#5-K1-K1#5	49.29(4)
O4-S1-O5	112.87(11)	O4-K1-K1#4	47.75(4)
O4-S1-K1	54.07(8)	O5#4-K1-O1#6	74.55(5)
O4-S1-K1#3	140.46(8)	O5#4-K1-O3#7	129.49(6)
O5-S1-C2	106.47(11)	O5#4-K1-O3#2	83.42(5)
O5-S1-K1	59.19(7)	O5#4-K1-O4#5	121.30(6)
O5-S1-K1#3	60.79(8)	O5#4-K1-O4	95.07(5)
K1#3-S1-K1	103.188(19)	O5#4-K1-O5	142.45(6)
O1#6-K1-O3#2	147.98(6)	O5#4-K1-O5#7	80.82(6)
O1#6-K1-O4#5	60.03(6)	O5#7-K1-O5	126.18(3)
O1#6-K1-O4	96.43(5)	O5#7-K1-S1#7	24.93(3)
O1#6-K1-O5#7	110.40(5)	O5#7-K1-S1	141.81(4)
O1#6-K1-O5	111.48(5)	O5-K1-S1#7	102.44(4)
O1#6-K1-S1#7	120.58(4)	O5#4-K1-S1#7	105.46(4)
O1#6-K1-S1	106.69(4)	O5-K1-S1	24.40(3)
O1#6-K1-K1#4	100.99(4)	O5#4-K1-S1	118.27(4)
O1#6-K1-K1#5	98.53(4)	O5#7-K1-K1#5	95.97(4)
O3#7-K1-O1#6	122.76(6)	O5-K1-K1#5	45.85(4)
O3#7-K1-O3#2	89.19(6)	O5-K1-K1#4	90.97(4)
O3#2-K1-O4	62.25(5)	O5#7-K1-K1#4	112.43(4)
O3#7-K1-O4#5	64.12(6)	O5#4-K1-K1#4	52.12(4)
O3#7-K1-O4	124.86(5)	O5#4-K1-K1#5	170.56(4)
O3#2-K1-O5	73.25(5)	S1#7-K1-S1	122.21(2)
O3#2-K1-O5#7	88.15(5)	S1#7-K1-K1#5	72.243(15)
O3#7-K1-O5	80.03(5)	S1-K1-K1#5	69.54(2)
O3#7-K1-O5#7	48.96(5)	S1#7-K1-K1#4	126.197(15)
O3#2-K1-S1#7	87.29(4)	S1-K1-K1#4	67.99(2)
O3#7-K1-S1#7	24.09(4)	K1#4-K1-K1#5	136.74(3)
O3#7-K1-S1	102.27(4)	C1-Br1-K1	112.60(8)

---

Table 4: Anisotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2$ ) for **59**.The anisotropic displacement factor exponent takes the form:  $-2\pi^2[ h^2 a^2 U^{11} + \dots + 2 h k a \cdot b \cdot U^{12} ]$ 

	$U^{11}$	$U^{22}$	$U^{33}$	$U^{23}$	$U^{13}$	$U^{12}$
C1	0.0147(13)	0.0090(11)	0.0054(12)	-0.0018(10)	-0.0008(10)	-0.0005(10)
C2	0.0100(12)	0.0108(11)	0.0048(12)	-0.0011(9)	0.0022(10)	0.0039(10)
C3	0.0133(13)	0.0112(12)	0.0054(12)	0.0004(10)	0.0029(10)	-0.0011(10)
C4	0.0134(13)	0.0063(11)	0.0078(12)	0.0007(9)	0.0000(10)	-0.0001(10)
C5	0.0126(14)	0.0129(12)	0.0099(12)	0.0003(10)	0.0032(11)	0.0025(10)
C6	0.0091(13)	0.0123(12)	0.0110(12)	0.0007(10)	0.0014(10)	-0.0013(10)
N1	0.0157(12)	0.0099(10)	0.0094(11)	0.0013(8)	0.0010(9)	0.0020(9)
O1	0.0188(10)	0.0116(9)	0.0155(10)	0.0006(8)	0.0015(8)	-0.0040(7)
O2	0.0224(11)	0.0118(9)	0.0328(12)	-0.0014(9)	0.0117(10)	0.0056(8)
O3	0.0094(9)	0.0146(9)	0.0175(10)	0.0023(8)	0.0052(8)	0.0005(7)
O4	0.0148(10)	0.0167(9)	0.0135(10)	-0.0054(8)	0.0031(8)	0.0015(7)
O5	0.0123(9)	0.0151(9)	0.0116(9)	0.0033(7)	0.0003(7)	0.0037(7)
S1	0.0086(3)	0.0102(3)	0.0089(3)	0.0000(2)	0.0019(2)	0.0019(2)
K1	0.0135(3)	0.0124(3)	0.0102(3)	0.0000(2)	0.0022(2)	0.0000(2)
Br1	0.01563(15)	0.00664(12)	0.01619(15)	0.00005(10)	0.00209(10)	-0.00100(10)

Table 5: Hydrogen coordinates and isotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2$ ) for **59**.

	x	y	z	U(eq)	Occupancy
H3	0.8158	0.8153	0.5956	0.012	1
H5	0.5283	0.8076	0.6542	0.014	1
H6	0.5333	0.5627	0.6608	0.013	1

Table 6: Torsion angles [°] for **59**. Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1  $x, y+1, z$ ; #2  $-x+2, -y+1, -z+1$ ; #3  $-x+2, y+1/2, -z+3/2$ ; #4  $x, -y+1/2, z-1/2$ ; #5  $x, -y+1/2, z+1/2$ ;  
 #6  $x, y-1, z$ ; #7  $-x+2, y-1/2, -z+3/2$

C1-C2-C3-C4	0.1(4)	K1#3-O5-S1-K1	129.63(7)
C1-C2-S1-O3	173.4(2)	K1#5-O5-S1-K1	-83.5(4)
C1-C2-S1-O4	52.5(2)	Br1-C1-C2-C3	178.41(18)
C1-C2-S1-O5	-67.6(2)	Br1-C1-C2-S1	-0.3(3)
C1-C2-S1-K1	-4.1(3)	Br1-C1-C6-C5	-178.52(19)
C1-C2-S1-K1#3	-132.44(19)		
C2-C1-C6-C5	0.8(4)		
C2-C1-Br1-K1	3.7(2)		
C2-C3-C4-C5	0.8(4)		
C2-C3-C4-N1	-177.7(2)		
C3-C2-S1-O3	-5.4(2)		
C3-C2-S1-O4	-126.2(2)		
C3-C2-S1-O5	113.6(2)		
C3-C2-S1-K1	177.15(15)		
C3-C2-S1-K1#3	48.8(2)		
C3-C4-C5-C6	-0.9(4)		
C3-C4-N1-O1	10.3(3)		
C3-C4-N1-O2	-171.0(2)		
C4-C5-C6-C1	0.1(4)		
C4-N1-O1-K1#1	-92.5(4)		
C5-C4-N1-O1	-168.3(2)		
C5-C4-N1-O2	10.4(3)		
C6-C1-C2-C3	-0.9(4)		
C6-C1-C2-S1	-179.63(19)		
C6-C1-Br1-K1	-176.97(16)		
N1-C4-C5-C6	177.6(2)		
O2-N1-O1-K1#1	88.9(4)		
S1-C2-C3-C4	178.92(18)		
K1#2-O3-S1-C2	-136.0(3)		
K1#3-O3-S1-C2	109.51(10)		
K1#2-O3-S1-O4	-21.5(4)		
K1#3-O3-S1-O4	-135.95(10)		
K1#3-O3-S1-O5	-5.20(12)		
K1#2-O3-S1-O5	109.3(4)		
K1#2-O3-S1-K1	41.3(4)		
K1#3-O3-S1-K1	-73.18(10)		
K1#2-O3-S1-K1#3	114.5(4)		
K1-O4-S1-C2	-122.96(10)		
K1#4-O4-S1-C2	142.41(17)		
K1-O4-S1-O3	123.50(10)		
K1#4-O4-S1-O3	28.9(2)		
K1-O4-S1-O5	-7.09(12)		
K1#4-O4-S1-O5	-101.72(18)		
K1#4-O4-S1-K1#3	-30.4(3)		
K1-O4-S1-K1#3	64.19(13)		
K1#4-O4-S1-K1	-94.63(18)		
K1#5-O5-S1-C2	38.5(4)		
K1#3-O5-S1-C2	-108.40(10)		
K1-O5-S1-C2	121.97(9)		
K1#5-O5-S1-O3	151.6(4)		
K1#3-O5-S1-O3	4.69(11)		
K1-O5-S1-O3	-124.94(9)		
K1#5-O5-S1-O4	-76.8(4)		
K1#3-O5-S1-O4	136.31(9)		
K1-O5-S1-O4	6.68(11)		
K1#5-O5-S1-K1#3	146.9(4)		
K1-O5-S1-K1#3	-129.63(7)		

### 6.3.2 Röntgenstrukturanalyse der Krone 36

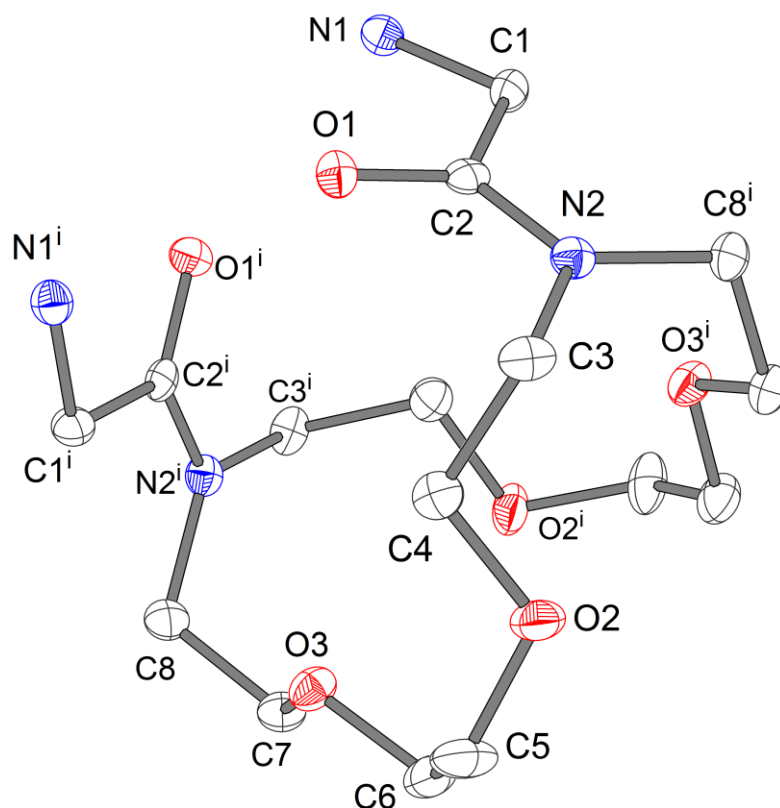


Abb. 3.2: Kristallstrukturbild von Verbindung **36**.

Table 1: Sample and crystal data for **35**.

Identification code	bh239_6	
Chemical formula	C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> F <sub>6</sub> N <sub>6</sub> O <sub>10</sub>	
Formula weight	686.62	
Temperature	100(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal size	0.070 x 0.090 x 0.210 mm	
Crystal system	monoclinic	
Space group	C 2/c	
Unit cell dimensions	$a = 24.0102(15)$ Å	$Z = 4$
	$b = 15.3475(9)$ Å	$\alpha = 90^\circ$
	$c = 8.6234(5)$ Å	$\beta = 90.705(2)^\circ$
		$\gamma = 90^\circ$
Volume	3177.5(3) Å <sup>3</sup>	
Density (calculated)	1.435 g/cm <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	0.133 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	1440	

Table 2: Data collection and structure refinement for **36**.

Theta range for data collection	2.65 to 25.50°
Index ranges	-29 ≤ h ≤ 29, -18 ≤ k ≤ 16, -10 ≤ l ≤ 10
Reflections collected	21829
Independent reflections	2960 [R(int) = 0.0614]
Coverage of independent reflections	99.9%
Absorption correction	multi-scan

---

Max. and min. transmission	0.9903 and 0.9725
Structure solution technique	direct methods
Structure solution program	SHELXS-97 (Sheldrick, 1990)
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>
Refinement program	SHELXL-97 (Sheldrick, 1997)
Function minimized	$\Sigma w(F_o^2 - F_c^2)^2$
Data / restraints / parameters	2960 / 0 / 210
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.084
Final R indices	2199 data; $I > 2\sigma(I)$ R1 = 0.0494, wR2 = 0.0890 all data R1 = 0.0803, wR2 = 0.0973
Weighting scheme	$w = 1 / [\sigma^2(F_o^2) + (0.0244P)^2 + 6.2460P]$
where $P = (F_o^2 + 2F_c^2) / 3$	
Largest diff. peak and hole	0.202 and -0.206 eÅ <sup>-3</sup>
R.M.S. deviation from mean	0.052 eÅ <sup>-3</sup>

Table 3: Atomic coordinates and equivalent isotropic atomic displacement parameters (Å<sup>2</sup>) for **36**. U(eq) is defined as one third of the trace of the orthogonalized U<sub>ij</sub> tensor.

	x	y	z	U(eq)	Occupancy
C1	0.39467(9)	0.62864(14)	0.1862(2)	0.0163(5)	1
C2	0.42284(9)	0.64661(14)	0.3409(2)	0.0142(5)	1
C3	0.43758(9)	0.73693(15)	0.5634(2)	0.0187(5)	1
C4	0.49552(10)	0.77341(14)	0.5357(3)	0.0204(5)	1
C5	0.54655(10)	0.90595(16)	0.5561(3)	0.0267(6)	1
C6	0.57210(10)	0.92334(15)	0.4008(3)	0.0241(6)	1
C7	0.61972(9)	0.86062(14)	0.1917(3)	0.0187(5)	1
C8	0.63922(9)	0.77500(14)	0.1274(3)	0.0182(5)	1
N1	0.42416(7)	0.55767(12)	0.1055(2)	0.0159(4)	1
N2	0.40687(7)	0.71713(12)	0.4195(2)	0.0152(4)	1
O1	0.46006(6)	0.59727(9)	0.38937(17)	0.0166(4)	1
O2	0.49347(6)	0.86543(10)	0.54831(19)	0.0245(4)	1
O3	0.59259(6)	0.84462(9)	0.33530(17)	0.0185(4)	1
C9	0.65508(10)	0.37685(14)	0.2078(3)	0.0184(5)	1
C10	0.69753(9)	0.39597(15)	0.3373(3)	0.0203(5)	1
O4	0.66590(7)	0.31559(11)	0.1228(2)	0.0354(5)	1
O5	0.61462(6)	0.42876(10)	0.20096(17)	0.0193(4)	1
F1	0.67496(6)	0.43267(10)	0.46335(15)	0.0347(4)	1
F2	0.73593(6)	0.45208(10)	0.28725(17)	0.0398(4)	1
F3	0.72470(6)	0.32579(10)	0.38687(18)	0.0415(4)	1
C11	0.80785(10)	0.60754(16)	0.2865(3)	0.0250(6)	1
C12	0.78831(11)	0.62411(17)	0.4433(3)	0.0320(6)	1
N3	0.82366(10)	0.59264(14)	0.1653(3)	0.0357(6)	1

Table 4. Bond lengths (Å) for **36**.

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1 -x+1, y, -z+1/2

C1-N1	1.478(3)	C7-C8	1.503(3)
C1-C2	1.514(3)	C7-H7A	0.99
C1-H1A	0.99	C7-H7B	0.99
C1-H1B	0.99	C8-N2#1	1.472(3)
C2-O1	1.240(3)	C8-H8A	0.99
C2-N2	1.335(3)	C8-H8B	0.99
C3-N2	1.468(3)	N1-H1C	0.91
C3-C4	1.521(3)	N1-H1D	0.91
C3-H3A	0.99	N1-H1E	0.91
C3-H3B	0.99	N2-C8#1	1.472(3)
C4-O2	1.417(3)	C9-O4	1.222(3)
C4-H4A	0.99	C9-O5	1.257(3)
C4-H4B	0.99	C9-C10	1.531(3)
C5-O2	1.419(3)	C10-F3	1.327(3)
C5-C6	1.504(3)	C10-F2	1.337(3)
C5-H5A	0.99	C10-F1	1.344(3)
C5-H5B	0.99	C11-N3	1.140(3)
C6-O3	1.424(3)	C11-C12	1.459(4)
C6-H6A	0.99	C12-H12A	0.98
C6-H6B	0.99	C12-H12B	0.98
C7-O3	1.428(3)	C12-H12C	0.98



Table 5. Bond angles (°) for **36**.

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1 -x+1, y, -z+1/2

N1-C1-C2	109.75(17)	O3-C7-H7B	110.0
N1-C1-H1A	109.7	C8-C7-H7B	110.0
C2-C1-H1A	109.7	H7A-C7-H7B	108.4
N1-C1-H1B	109.7	N2#1-C8-C7	113.09(18)
C2-C1-H1B	109.7	N2#1-C8-H8A	109.0
H1A-C1-H1B	108.2	C7-C8-H8A	109.0
O1-C2-N2	122.29(19)	N2#1-C8-H8B	109.0
O1-C2-C1	119.87(19)	C7-C8-H8B	109.0
N2-C2-C1	117.82(19)	H8A-C8-H8B	107.8
N2-C3-C4	113.19(17)	C1-N1-H1C	109.5
N2-C3-H3A	108.9	C1-N1-H1D	109.5
C4-C3-H3A	108.9	H1C-N1-H1D	109.5
N2-C3-H3B	108.9	C1-N1-H1E	109.5
C4-C3-H3B	108.9	H1C-N1-H1E	109.5
H3A-C3-H3B	107.8	H1D-N1-H1E	109.5
O2-C4-C3	108.78(18)	C2-N2-C3	116.90(18)
O2-C4-H4A	109.9	C2-N2-C8#1	124.70(18)
C3-C4-H4A	109.9	C3-N2-C8#1	118.40(17)
O2-C4-H4B	109.9	C4-O2-C5	114.09(18)
C3-C4-H4B	109.9	C6-O3-C7	111.20(16)
H4A-C4-H4B	108.3	O4-C9-O5	129.0(2)
O2-C5-C6	114.3(2)	O4-C9-C10	116.1(2)
O2-C5-H5A	108.7	O5-C9-C10	114.82(19)
C6-C5-H5A	108.7	F3-C10-F2	106.77(19)
O2-C5-H5B	108.7	F3-C10-F1	106.34(18)
C6-C5-H5B	108.7	F2-C10-F1	106.13(19)
H5A-C5-H5B	107.6	F3-C10-C9	113.54(19)
O3-C6-C5	110.45(19)	F2-C10-C9	110.07(18)
O3-C6-H6A	109.6	F1-C10-C9	113.49(18)
C5-C6-H6A	109.6	N3-C11-C12	178.3(3)
O3-C6-H6B	109.6	C11-C12-H12A	109.5
C5-C6-H6B	109.6	C11-C12-H12B	109.5
H6A-C6-H6B	108.1	H12A-C12-H12B	109.5
O3-C7-C8	108.47(17)	C11-C12-H12C	109.5
O3-C7-H7A	110.0	H12A-C12-H12C	109.5
C8-C7-H7A	110.0	H12B-C12-H12C	109.5

Table 6: Torsion angles (°) for **36**.

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1 -x+1, y, -z+1/2

N1-C1-C2-O1	-8.5(3)	C6-C5-O2-C4	84.9(3)
N1-C1-C2-N2	170.35(18)	C5-C6-O3-C7	-176.82(19)
N2-C3-C4-O2	98.4(2)	C8-C7-O3-C6	-178.84(18)
O2-C5-C6-O3	-75.1(3)	O4-C9-C10-F3	-29.7(3)
O3-C7-C8-N2#1	67.1(2)	O5-C9-C10-F3	152.52(19)
O1-C2-N2-C3	3.3(3)	O4-C9-C10-F2	89.9(2)
C1-C2-N2-C3	-175.56(18)	O5-C9-C10-F2	-87.9(2)
O1-C2-N2-C8#1	-176.13(19)	O4-C9-C10-F1	-151.4(2)
C1-C2-N2-C8#1	5.1(3)	O5-C9-C10-F1	30.9(3)
C4-C3-N2-C2	73.8(2)		
C4-C3-N2-C8#1	-106.8(2)		
C3-C4-O2-C5	167.87(18)		

Table 7. Anisotropic atomic displacement parameters (Å<sup>2</sup>) for **36**.The anisotropic atomic displacement factor exponent takes the form:  $-2\pi^2[ h^2 a^{-2} U^{11} + \dots + 2 h k a^{-1} b^{-1} U^{12} ]$ 

	U <sup>11</sup>	U <sup>22</sup>	U <sup>33</sup>	U <sup>23</sup>	U <sup>13</sup>	U <sup>12</sup>
C1	0.0158(12)	0.0151(12)	0.0180(12)	-0.0024(9)	0.0005(10)	0.0021(10)
C2	0.0146(12)	0.0134(11)	0.0148(11)	0.0017(10)	0.0040(9)	-0.0042(10)
C3	0.0230(13)	0.0187(12)	0.0145(11)	-0.0018(10)	0.0037(10)	-0.0050(10)
C4	0.0219(13)	0.0190(12)	0.0201(12)	-0.0005(10)	-0.0002(10)	-0.0008(10)
C5	0.0282(14)	0.0250(14)	0.0270(13)	-0.0123(11)	0.0063(11)	-0.0115(11)
C6	0.0254(14)	0.0165(13)	0.0306(14)	-0.0047(11)	0.0043(11)	-0.0036(11)
C7	0.0198(13)	0.0174(12)	0.0190(12)	0.0021(10)	0.0024(10)	-0.0047(10)
C8	0.0168(12)	0.0179(12)	0.0201(12)	0.0038(10)	0.0034(10)	-0.0036(10)
N1	0.0161(10)	0.0174(10)	0.0143(9)	-0.0008(8)	-0.0014(8)	-0.0010(8)
N2	0.0150(10)	0.0163(10)	0.0142(9)	-0.0005(8)	0.0024(8)	-0.0014(8)
O1	0.0153(8)	0.0178(8)	0.0168(8)	0.0014(7)	0.0003(7)	0.0020(7)
O2	0.0205(9)	0.0177(9)	0.0354(10)	-0.0076(7)	0.0064(7)	-0.0060(7)
O3	0.0216(9)	0.0151(8)	0.0190(8)	-0.0001(7)	0.0049(7)	-0.0011(7)
C9	0.0218(13)	0.0167(12)	0.0168(12)	0.0023(10)	0.0043(10)	0.0001(11)
C10	0.0162(12)	0.0227(13)	0.0219(13)	0.0013(10)	0.0030(10)	-0.0002(11)
O4	0.0394(11)	0.0340(11)	0.0327(10)	-0.0127(9)	-0.0081(9)	0.0167(9)
O5	0.0205(9)	0.0199(9)	0.0174(8)	0.0005(7)	-0.0003(7)	0.0056(7)
F1	0.0278(8)	0.0563(10)	0.0202(7)	-0.0088(7)	-0.0001(6)	0.0031(7)
F2	0.0346(9)	0.0475(10)	0.0376(9)	-0.0001(7)	0.0050(7)	-0.0234(8)
F3	0.0377(9)	0.0364(9)	0.0499(10)	0.0030(8)	-0.0186(8)	0.0113(7)
C11	0.0225(14)	0.0216(13)	0.0309(15)	0.0071(11)	0.0004(12)	-0.0034(11)
C12	0.0344(16)	0.0325(15)	0.0293(14)	-0.0015(12)	0.0030(12)	-0.0085(12)
N3	0.0418(14)	0.0309(13)	0.0347(14)	0.0079(11)	0.0113(11)	0.0006(11)

Table 8. Hydrogen atomic coordinates and isotropic atomic displacement parameters (Å<sup>2</sup>) for **36**.

	x/a	y/b	z/c	U(eq)
H1A	0.3554	0.6117	0.2027	0.02
H1B	0.3950	0.6820	0.1217	0.02
H3A	0.4409	0.6830	0.6260	0.022
H3B	0.4160	0.7797	0.6242	0.022
H4A	0.5221	0.7495	0.6132	0.024
H4B	0.5083	0.7566	0.4311	0.024
H5A	0.5721	0.8683	0.6172	0.032
H5B	0.5430	0.9619	0.6123	0.032
H6A	0.5438	0.9493	0.3302	0.029
H6B	0.6030	0.9655	0.4130	0.029
H7A	0.6519	0.9000	0.2084	0.022
H7B	0.5935	0.8888	0.1176	0.022
H8A	0.6629	0.7862	0.0365	0.022
H8B	0.6624	0.7451	0.2069	0.022
H1C	0.4131	0.5563	0.0042	0.019
H1D	0.4160	0.5058	0.1511	0.019
H1E	0.4615	0.5671	0.1115	0.019
H12A	0.7857	0.5689	0.4998	0.048
H12B	0.7515	0.6517	0.4381	0.048
H12C	0.8146	0.6628	0.4972	0.048

Table 9. Hydrogen bond distances (Å) and angles (°) for **36**.  
Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1      -x+1, y, -z+1/2

#2      -x+1, -y+1, -z

	Donor-H	Acceptor-H	Donor-Acceptor	Angle
N1-H1E...O1#1	0.91	1.94	2.845(2)	174.3
N1-H1D...O5#1	0.91	1.89	2.758(2)	157.6
N1-H1C...O5#2	0.91	1.90	2.799(2)	170.9

---

## **7. Literatur**

- [1] Wallin, E., von Heijne, G., *Protein Sci.*, **1998**, 7, 1029-1038
- [2] Lodish H, Berk A, Zipursky LS, *et al.* (2004). *Molecular Cell Biology* (4th ed.). New York: Scientific American Books.
- [3] Liang, B., Tamm, L. K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, 104, 16140.
- [4] Hübner, C. A., Jentsch, T. J., *Hum. Mol. Gen.*, **2002**, 20, 2435-2445.
- [5] Skou, J.C., *Angew. Chemie*, **1998**, 110, 2452-2461.
- [6] Hill, B., *Ionic Channels of Excitable Membranes*, Sinauer Associates, Incorporated, Sunderland, 3rd edn, **2001**.
- [7] Jentsch, T. J., Hübner, C. A., Fuhrmann, J. C., *Nat. Cell Bio.*, **2004**, 6, 1039-1047.
- [8] Schulz, G. E., *Curr Opin Struct Biol*, **2000**, 10, 443.
- [9] Yildiz, O., Vinothkumar, K. R., Goswami, P., Kuhlbrandt, W., *EMBO J*, **2006**, 25, 3702.
- [10] Bolter, B., Soll, J., *EMBO J*, **2001**, 20, 935.
- [11] Gromiha, M. M., Majumdar, R., Ponnuswamy, P. K., *Protein Eng*, **1997**, 10, 497.
- [12] Schulz, G. E., *Biochim Biophys Acta*, **2002**, 1565, 308.
- [13] Behlau, M., Mills, D. J., Quader, H., Kuhlbrandt, W., Vonck, J., *J. Mol. Biol.*, **2001**, 305, 71.
- [14] Klebba, P. E., Hofnung, M., Charbit, A., *EMBO J*, **1994**, 13, 4670.
- [15] Queralt-Martín, M., Aguilera-Arzo, M., Alcaraz, A., Aguilera, V. M., *Intrgr. Biol.*, **2011**, 3, 159-172.
- [16] Phale, P. S., Philippsen, A., Kiefhaber, T., Koebnik, R., Phale, V. P., Schirmer, T., Rosenbusch, J. P., *Biochemistry*, **1998**, 37, 15663.
- [17] Van Gelder, P., Saint, N., Phale, P., Eppens, E. F., Prilipov, A., van Boxtel, R., Rosenbusch, J. P., Tommassen, J., *J. Mol. Biol.*, **1997**, 269, 468.
- [18] Buchanan, S. K., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1999**, 9, 455.
- [19] Subbarao, G. V., van der Berg, B., *J. Mol. Biol.*, 2006, 360, 750-759.
- [20] Forst, D., Welte, W., Wacker, T., Diederichs, K., *Nature Structural Biology*, **1998**, 5, 37 – 46.
- [21] Conlan, S., Zhang, Y., Cheley, S., Bayley, H., *Biochemistry*, **2000**, 39, 11845.
- [22] Grosse, W., *Dissertation*, **2011**.
- [23] Conlan, S., Bayley, H., *Biochemistry*, **2003**, 42, 9453.

- 
- [24] Radhakrishnan, A., Anderson, T. G., McConnell, H. M., *PNAS*, **2000**, 97(23): 12422-12427.
- [25] Konstantinov, Y., Dietrich, A., Koulintchenko, M., *EMBO*, **2003**, 22, 1245-1254.
- [26] Thinnes, F.P., Götz, H., Kayser, H., Benz, R., Schmidt, W.E., Kratzin, H.D. Hilschmann, N., *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **1989**, 370, 1253–1264.
- [27] Blachly-Dyson, E., Peng, S., Colombini, M., Forte M., *Science*, **1990**, 247, 1233-1236
- [28] Song, J., Midson, C., Blachy-Dyson, E., Forte, M., Colombini, M., *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 24406-24413.
- [29] Song, J., Midson, C., Blachy-Dyson, E., Forte, M., Colombini, M., *Biophys. J.*, **1998**, 74, 2926-2944.
- [30] Mertins, B., Psakis, G., Grosse, W., Back, K. C., Salisowski, A., Reiss, P., Koert, U., Esssen, L.-O., *PLoS ONE*, **2012**, 7, e47938.
- [31] Ujwal R, Cascio D, Colletier JP, Faham S, Zhang J, et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2008**, 105: 17742.
- [32] McCommis, K. S., Baines, C. P., *Biochimica et Biophysica Acta*, **2012**, 1818, 1444–1450
- [33] Bayrhuber, M., Meins, T., Habeck, M., Becker, S., Giller, K., Villinger, S., Vonnrhein, C., Griesinger, C., Zweckstetter, M., Zeth, K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2008**, 105, 15370-15375.
- [34] Hiller, S., Garces, R. G., Malia, T. J., Orekhov, V. Y., Colombini, M., Wagner, G., *Science*, **2008**, 321, 1206-1210.
- [35] Hiller, S., Abramson, J., Mannella, C., Wagner, G., Zeth, K., *Trends in Biochemical Science*, **2010**, 35, 514-521.
- [36] al Jamal, J. A., Palmieri, F., De Pinto, V., *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, 12977-12982.
- [37] Shao, L., Kinnally, K.W., Mannella, C.A., *Biophys. J.*, **1996**, 71, 778–786.
- [38] Abrecht, H., Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J.M., Homble, F., *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 40992–40999.
- [39] Colombini, M., *J. Membr. Biol.*, **1980**, 53, 79-84.
- [40] De Pinto, V., Prezioso, G., Thinnes, F., Link, T.A., Palmieri, F., *Biochemistry*, **1991**, 30, 10191–10200.
- [41] Colombini, M., *Biochim. Biophys. Acta*, **2012**, 1818, 1457-1465.
- [42] Koppel, D.A., Kinnally, K.W., Masters, P., Forte, M., Blachly-Dyson, E., Mannella, C.A., *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 13794–13800.
-

- 
- [43] Popp, B., Court, D.A., Benz, R., Neupert, W., Lill, R., *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 13593–13599.
- [44] Homblé, F., Krammer, E.-M., Prévost, M., *Biochimica et Biophysica Acta*, **2012**, 1818, 1486–1501.
- [45] Winterhalter, M., *Curr. Opin. Coll. Int. Sci.*, **2000**, 5, 250-255.
- [46] Mueller, P., Rudin, D. O., Ti Tien, H., Wescott, W. C., *J. Phys. Chem.*, **1963**, 67, 534-535.
- [47] [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Lipid\\_unsaturation\\_effect.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Lipid_unsaturation_effect.svg), 16.04.2014.
- [48] Wiese, A., Munstermann, M., Gutschmann, T., *J. Membr. Biol.*, **1998**, 162, 127-138.
- [49] Tabushi, I., Kuroda, Y., Yokota, K., *Tetrahedron Lett.*, **1982**, 23, 4601–4604.
- [50] Neevel, J. G., Nolte, R., *Tetrahedron Lett.*, **1984**, 25, 2263–2266.
- [51] Carmichel, V. E., Dutton, P., Fyles, T., James, T., Swan, J., Zojaji, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 767–769.
- [52] Nakano, A., Xie, Q., Mallen, J., Echegoyen, L., Gokel, G. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 1287–1288.
- [53] Voyer, N., Robitaille, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 6599–6600.
- [54] Ghadiri, M. R., Granja, J. R., Buehler, L. K., *Nature*, **1994**, 369, 301–304.
- [55] Koert, U., Stein, M., Harms, K., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1994**, 33, 1180.
- [56] (a) Koert, U., Stein, M., Harms, K., *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34, 2299. (b) Koert, U., Stein, M., Harms, K., *Liebigs Ann.*, **1995**, 1415.
- [57] Wagner, H., Koert, U., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1994**, 33, 1873.
- [58] Koert, U., Stein, M., Wagner, H., *Chem.–Eur. J.*, **1997**, 3, 1170.
- [59] Wagner, H., Harms, K., Koert, U., Meder, S., Boheim, G., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1996**, 35, 2643.
- [60] Schrey, A., Osterkamp, F., Straudi, A., Rickert, C., Wagner, H., Koert, U., Herrschaft, B., Harms, K., *Eur. J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 2977.
- [61] Fyles, T. M., Looock, D., Zhou, X., *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 2997.
- [62] Goto, C., Yamamura, M., Satake, A., Kobuke, Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 12152–12159.
- [63] Winum, J.-Y., Matile, S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 7961–7962.
- [64] Sakai, N., Baumeister, B., Matile, S., *ChemBioChem*, **2000**, 1, 123–125.
- [65] Borisenko, V., Burns, D. C., Zhang, Z., Woolley, G. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 6364.
- [66] Arndt, H.-D., Knoll, A., Koert, U., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 2076.

- 
- [67] Vescovi, A., Knoll, A., Koert, U., *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, *1*, 2983.
- [68] (a) Pfeifer, J. R., Reiß, P., Koert, U., *Angew. Chem.*, **2006**, *118*, 515-518. (b) Pfeifer, J. R., Reiß, P., Koert, U., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 501-504.
- [69] Kaucher, M. S., Harrell, W. A., Jr, Davis, J. T., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 38–39.
- [70] Zhou, X., Liu, G., Yamato, K., Shen, Y., Cheng, R., Wei, X., Bai, W., Gao, Y., Li, H., Liu, Y., Liu, F., Czajkowsky, D. M., Wang, J., Dabney, M. J., Cai, Z., Hu, J., Bright, F. V., He, L., Zeng, X. C., Shao, Z., Gong, B., *Nat. Commun.*, **2012**, *3*, 949.
- [71] Jung, M., Kim, H., Baek, K., Kim, K., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2008**, *47*, 5755–5757.
- [72] Valiyaveetil, F. I., Sekedat, M., Muir, T. W. MacKinnon, R., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2004**, *43*, 2504-2507.
- [73] Uhlenheuer, D. A., Milroy, L.-G., Neirynck, P., Brunsveld, L., *J. Mater. Chem.*, **2011**, *21*, 18919–18922.
- [74] Futaki, S., Aoki, M., Ishikawa, T., Kondo, F., Asahara, T., Niwa, M., Nakaya, Y., Yagami, T., Kitagawa, K., *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, *7*, 187-192.
- [75] Bernardes, G. J. L., Chalker, J. M., Errey, J. C., Davis, B. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 5052-5054.
- [76] Banghart, M., Borges, K., Isacoff, E., Trauner, D., Kramer, R. H., *Nat. Neurosci.*, **2004**, *7*, 1381-1386.
- [77] Reitz, S., Cebi, M., Reiss, P., Studnik, G., Linne, U., Koert, U., Essen, L.-O., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 4853-4857.
- [78] Grosse, W., Reiss, P., Reitz, S., Cebi, M., Lubben, W., Koert, U., Essen, L.-O., *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, *18*, 7716-7723.
- [79] Jayasinghe, L., Bayley, H., *Mol. Membr. Biol.*, **2004**, *21*, 209-220.
- [80] Howorka, S., Cheley, S. and Bayley, H., *Nat. Biotechnol.*, **2001a**, *19*, 636-639.
- [81] Gu, L., Braha, O., Conlan, S., Cheley, S., Bayley, H., *Nature*, **1999**, *398*, 686-690.
- [82] Chen, M., Khalid, S., Sansom, M. S. P., Bayley, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2008**, *105*, 6272-6277.
- [83] Azoulay-Zohar, H., Israelson, A., Abu-Hamad, S., Shoshan-Barmatz, V., *Biochem J.*, **2004**, *377*, 347-55.
- [84] Krasnov, G. S., Dmitriev, A. A., Lakunina, V. A., Kirpiy, A. A., Kudryavtseva, A. V., *Expert Opin. Ther. Targets*, **2013**, *17*, 1221-1233.
- [85] Reddy, P.H., *Biochimica et Biophysica Acta*, **2013**, *1832*, 67–75.
-

- 
- [86] Manczak, M., Reddy, P. H., *Hum Mol Genet.*, **2012**, *21*, 5131-5146.
- [87] Hirsch, B., *Diplomarbeit*, **2009**.
- [88] Davis, M. C., *Synthetic Communicatioins*, **2006**, *36*, 1343-1346.
- [89] Reitz, S., Cebi, M., Reiß, P., Studnik, g., Linne, U., Koert, U., Essen, L.-O., *Angew. Chem.*, **2009**, *121*, 4947-4951.
- [90] Percec, Virgil *et al.*, *Chem. Eur. J.*, **2007**, *13*, 3330-3345.
- [91] Courtin, A., *Helvetica Chimica Acta*, **1983**, *66*, 68-75.
- [92] Gatto, V. J., Arnold, K. A., Viscariello, A. M., Miller, S. R., Morgan, C. R., Gokel, G. W., *J. Org. Chem.*, **1986**, *51*, 5373-5384.
- [93] Fages, F., Desvergne, J.-P., Bouas-Laurant, H., Marsau, P., Lehn, J.-M., Kotzyba-Hilbert, F., Albrecht-Gary, A.-M., Al-Joubbeh, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 8672-8680
- [94] Ghorbani-Vaghei, R., Veisi, H., Amiri, M., *J. Ira. Chem. Soc.*, **2009**, *6*, 761-768.
- [95] Grauer, A., *Chemistry - A European Journal*, **2008**, *14*, 8922-8927.
- [96] Zhang, B., Breslow, R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 1676-1681.
- [97] Uenishi, J., Tanaka, T., Nishiwaki, K., Wakabayashi, S., Oae, S., Tsukube, H., *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 4382-4388.
- [98] Smith, A. P., Lamba, J. J. S., Fraser, C. L., *Organic Syntheses*, **2004**, *10*, 107-112.
- [99] Messerer, M., Wennemers, H., *Synlett*, **2011**, *4*, 499-502.
- [100] Back, K., *Diplomarbeit*, **2010**, Philipps-Universität, Marburg.
- [101] Salisowski, A., *Diplomarbeit*, **2010**, Philipps-Universität, Marburg.
- [102] Gunasekera, D., Kemp, R.G., *Protein Expr Purif.*, **1999**, *16*, 448-53.
- [103] Dagert, M., Ehrlich, S. D., *Gene*, **1979**, *6*, 23.
- [104] Mittapalli, G. K.; Osornio, Y. M.; Guerrero, M. A.; Reddy, K. R.; Krishnamurthy, R.; Eschenmoser, A., *Angew. Chem.*, **2007**, *119*,. 2530-2536.
- [105] Merrifield, R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, *85*, 2149-2154.
- [106] Avestin, **2008**.
- [107] Grosse, W., *Diplomarbeit*, **2008**.
- [108] Borowiak, A., *Bachelorarbeit*, **2013**.
- [109] Mülhardt, C., **2006**, *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics* (Elsevier GmbH, München) 5. Ed: 1-298.
- [110] Child, A. D., Reynolds, J.R., *Macromolecules*, **1994**, *27*, 1975-1977.
- [111] Spiliopoulos, I., K., Mikoyannidis, J., A., *Macromolecules*, **1998**, *31*, 1236-1245.
- [112] Still, W. C., Kahn, M., Mitra, A., *J. Org. Chem.*, **1961**, *26*, 1109-1111.



- 
- [113] Prilipov, A., Phale, P. S., Van Gelder, P., Rosenbusch, J. P., Koebnik, R., *FEMS Microbiology Letters*, **1998**, *163*, 65-72.
- [114] Gama, M. R., da Costa Silva, R. G., Collins, C. H., Bottoli, C. B. G., *TrAC*, **2012**, *37*, 48-60.
- [115] Jandera, P., *J. Chromatogr. A*, **2012**, *1255*, 112-129.
- [116] Song, J., Wang, J., Jozwiak, A. A., Hu, W., Swiderski, P. M., Chen, Y., *Protein Sci.*, **2009**, *18*, 2492–2499.
- [117] Ghosh, S. S., Kao, P. M., McCue, A. W., Chappelle, H. L., *Bioconjugate Chemistry*, 1990, *1*, 71-76.
- [118] Brewer, C. F., Riehm, J. P., *Analytical Biochemistry*, 1967, *18*, 248-255.
- [119] Hackeng, T. M., Griffin, J. H., Dawson, P. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, *96*, 10068-10073.
- [120] Meudtner, R. M., Hecht, S., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 4926-4930.